



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA
DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Riproduzione, Produzione, Benessere Animale (XXVI CICLO)
(Coordinatore: Prof. Sergio Ledda)

**IDENTIFICAZIONE DI NUOVI MARCATORI TUMORALI
NELLE NEOPLASIE MAMMARIE DEL CANE:
APPLICAZIONE DI TECNOLOGIE MOLECOLARI
INNOVATIVE**

Docente Guida

Dott.^{ssa} Elisabetta Antuofermo

Direttore

Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato del

Dott. Giovanni Pietro Burrari

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Riproduzione, Produzione, Benessere Animale (XXVI CICLO)
(Coordinatore: Prof. Sergio Ledda)

**IDENTIFICAZIONE DI NUOVI MARCATORI TUMORALI
NELLE NEOPLASIE MAMMARIE DEL CANE:
APPLICAZIONE DI TECNOLOGIE MOLECOLARI
INNOVATIVE**

Docente Guida

Dott.^{ssa} Elisabetta Antuofermo

Direttore

Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato del

Dott. Giovanni Pietro Burrai

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale dell'Università degli Studi di Sassari – XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

Abstract

Canine mammary tumors (CMT) are the most common neoplasms in female dogs and the discovery of diagnostic, prognostic, and therapeutic markers is essential for improving the disease outcomes and the animal welfare. The aims of this study were to investigate the role of the Receptor tyrosine-kinase ErbB-2 (HER2) and to discover new potential tumor markers in CMT using innovative proteomic approaches. HER2 protein and RNA expressions were determined by immunohistochemistry (IHC) with an antibody extensively used in veterinary medicine and by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) as well as by Western Immunoblotting (WB) and Reverse-Phase Protein Arrays (RPPA). An orthogonal validation of HER2 protein expression was carried out using high-resolution mass spectrometry (MS). A diffuse cytoplasmic staining related to antibody lack of specificity was observed by IHC and further confirmed by WB. No differences between benign and malignant neoplasms were noted at mRNA level and the MS technique failed to detect HER2 peptides in the CMT. These results indicate a minor role of HER2 in CMT. Further, 40 proteins were found to be differentially expressed in normal mammary gland and in CMT by MS. Proteins related to glucose and to mitochondrial function as Transketolase, Transketolase like 1, and Prohibitin 2 were also investigated by IHC. The differences observed in hyperplastic and neoplastic lesions compared to normal mammary gland suggest these proteins as new potential markers for CMT.

Riassunto

Il tumore mammario canino (CMT) è la neoplasia più frequentemente riscontrata nei cani di sesso femminile. L'identificazione, con tecnologie molecolari innovative, di marcatori tumorali prognostici, diagnostici e terapeutici è ritenuta uno dei principali obiettivi della ricerca in oncologia veterinaria nel prevedere il decorso delle patologie e nel tutelare il benessere degli animali. Lo scopo del nostro studio è stato quello di approfondire il ruolo svolto dal Recettore tirosin-chinasico ErbB-2 (HER2) nei CMT e di individuare, attraverso tecniche di proteomica differenziale e di immunistochemica (IHC), nuovi potenziali marcatori tumorali nelle neoplasie mammarie del cane. L'espressione proteica dell'HER2 è stata valutata in spettrometria di massa ad alta risoluzione (MS) ed in IHC, Western Immunoblotting (WB) e Reverse-Phase Protein Arrays (RPPA) utilizzando un anticorpo frequentemente impiegato in medicina veterinaria. L'espressione genica è stata determinata attraverso metodica real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Nei CMT è stata osservata un'immunopositività citoplasmatica dovuta alla scarsa specificità dell'anticorpo, come dimostrato dalla mancanza, in WB, della banda corrispondente al peso molecolare di HER2 nel cane. L'assenza di peptidi appartenenti all'HER2, osservata in spettrometria di massa, e la mancanza di differenze significative nell'espressione di mRNA tra tumori benigni e maligni indicano un ruolo marginale di questo marcatore nei CMT.

L'analisi in spettrometria di massa ha consentito di identificare 40 proteine differenzialmente espresse tra tessuto ghiandolare mammario sano e tessuto neoplastico. Alcune di queste, legate al metabolismo del glucosio e all'attività mitocondriale, come la Transchetolasi, la Transchetolasi like 1 e la Proibitina 2 sono state investigate mediante tecnica IHC. Le differenze significative di espressione proteica riscontrate

nelle lesioni iperplastiche e nei tumori mammari benigni e maligni rispetto alla ghiandola mammaria sana suggeriscono l'utilizzo di queste proteine come nuovi e potenziali marcatori per i CMT.

INDICE

1. Salute e Benessere animale	
1.1	1
1.2	2
2. Oncologia veterinaria: i tumori mammari del cane	
2.1	4
2.2	4
2.3	8
2.4	11
2.5	13
2.6	14
2.7	15
2.8	17
3. Marcatori tumorali nelle neoplasie mammarie del cane	
3.1	20
3.2	21
3.3	26
4. Obiettivi della tesi	
5. Espressione dell'<i>ERBB2</i>/HER2 nel tumore mammario del cane	
5.1	32
5.1.1	32
5.1.2	35
5.1.3	37
5.1.4	40
5.1.5	43
5.1.6	48
5.2	51
5.3	60
5.4	68
5.5	74

6. Identificazione di marcatori tumorali nelle neoplasie mammarie del cane	
6.1 Introduzione	75
6.1.2 Metabolismo del glucosio e tumori	76
6.1.3 Transchetolasi (TKT)	81
6.1.4 Proibitine	85
6.2 Materiali e Metodi	89
6.3 Risultati	94
6.4 Discussione	104
6.5 Conclusioni	110
7. Bibliografia	111
Ringraziamenti	133

1. Salute e benessere animale

1.1 Definizione e normativa sul benessere animale

E' nel 1965, anno di pubblicazione del *Rapporto Brambell*, che viene definita per la prima volta la nascita di una strategia sul benessere animale. Brambell, infatti, in quegli anni enunciava i principi cardine, chiamati “cinque libertà fondamentali”, a garanzia del benessere animale:

- I. *Libertà dalla fame, dalla sete e dalla malnutrizione*, attraverso l'accesso all'acqua ed agli alimenti tale da garantire all'animale lo stato di salute e vigore fisico.
- II. *Libertà dai disagi ambientali*, garantendo un ambiente adeguato alle condizioni di ogni specie.
- III. *Libertà dal dolore, dai traumi e dalle malattie*, adottando sistemi di prevenzione, di diagnosi e di trattamento delle varie patologie.
- IV. *Libertà di manifestare le caratteristiche comportamentali specie-specifiche*, garantendo spazi e strutture adeguati in grado di favorire la socializzazione tra gli animali della stessa specie.
- V. *Libertà da paura e stress*, assicurando condizioni di vita e trattamenti che evitino sofferenza fisica e mentale.

Tali principi, così come le normative da qui derivate, riguardavano sostanzialmente il benessere degli animali da reddito allevati a scopo alimentare. Successivamente la Commissione Europea, nel documento denominato “*Strategia dell'Unione Europea per la protezione e il benessere degli animali 2012- 2015*”, estende il concetto di tutela del benessere animale anche agli animali da compagnia, come il cane ed il gatto. Negli atti di lavoro della Commissione Europea viene citata la definizione di benessere animale

riportata dalla *World Organization for Animal Health (OIE)*, secondo cui "un animale è in un buono stato di benessere se, come dimostrato da evidenze scientifiche, è sano, gode di condizioni confortevoli, è ben nutrito, sicuro, capace di esprimere comportamenti innati e non soffre stati spiacevoli come dolore, paura e stress" (Terrestrial Animal Health Code of the World Organisation for Animal Health (OIE), 2013).

Da questa definizione si capisce come la valutazione dello stato di benessere di un animale deve necessariamente considerare una serie di discipline come la fisiologia, le scienze veterinarie e l'etologia al fine di valutare lo stato di salute globale dell'animale, inteso come l'insieme delle condizioni fisiche e psichiche necessarie per vivere in completa armonia con il proprio ambiente (Carenzi & Verga, 2009).

Secondo la definizione fornita dall'*OIE* ed in base alla *III* libertà fondamentale enunciata da Brambell (1965), si comprende che qualsiasi stato patologico che causa sofferenza e dolore è in grado di alterare lo stato di benessere dell'animale.

1.2 Il tumore come causa di dolore nell'animale

La parola tumore deriva dal latino *tumor* (rigonfiamento) ed in medicina viene solitamente utilizzata per indicare una patologia caratterizzata da un eccessivo accrescimento di un tessuto dell'organismo. Il termine neoplasia indica un processo di nuova formazione e diventa sinonimo del precedente quando il tessuto è costituito da cellule "neoformate" (Kumar et al., 2005). Le neoplasie vengono classificate in benigne e in maligne e la maggior parte di queste patologie determinano nell'animale una condizione di stress e di dolore tale da influenzare negativamente il benessere dello stesso. Il dolore acuto aumenta il rischio di morbidità e mortalità, mentre quello cronico

altera la qualità della vita dell'animale. La sensibilità al dolore varia da individuo ad individuo e può cambiare durante il decorso della malattia (De Lorimier & Fan, 2005).

Il cancro rappresenta la principale causa di morte negli animali da compagnia e, considerando le recenti stime sull'incidenza di questa patologia, circa 58 milioni di cani e di gatti, pari al 23% dei soggetti presenti negli Stati Uniti ed in Europa, svilupperanno una forma tumorale nel corso della loro vita (Strategia dell'Unione Europea per la protezione e il benessere degli animali 2012-2015; Withrow, 2007).

Attualmente, in medicina veterinaria, a differenza di quanto riportato nell'uomo, non esistono stime sul numero degli animali che soffrono di dolore causato dal cancro e la maggior parte dei soggetti colpiti da tumore muore senza aver ricevuto un adeguata terapia del dolore (De Lorimier & Fan, 2005).

Si comprende come, in queste circostanze, il ruolo giocato dalla ricerca in oncologia veterinaria sia sempre più importante per tutelare il benessere degli animali colpiti da tumore.

In quest'ottica, l'applicazione di tecnologie biomolecolari innovative, come la proteomica e la genomica, oltre all'utilizzazione di tecniche convenzionali come l'immunoistochimica, diventa essenziale per la scoperta di nuovi marcatori tumorali al fine di sviluppare nuove strategie diagnostiche, prognostiche e terapeutiche per combattere più efficacemente l'insorgenza e la progressione dei tumori negli animali domestici.

2. Oncologia veterinaria: i tumori mammari del cane

2.1 Dati di incidenza

Il tumore mammario canino (CMT) è la neoplasia più frequentemente riscontrata nelle cagne (Sorenmo, 2003). Tuttavia, l'incidenza di questi tumori è difficile da determinare. Due studi di popolazione, condotti nel Regno Unito ed in Svezia, riportano, rispettivamente, una prevalenza pari a 205/100.000 e a 111/10.000 casi di CMT per anno (Dobson et al., 2002; Egenvall et al., 2005).

In Italia, una recente ricerca riporta, in una popolazione di cani provenienti dalle provincie di Venezia e Vicenza, una frequenza del CMT del 56% rispetto alle altre forme tumorali che colpiscono questi animali (Vascellari et al., 2009). Uno studio analogo, condotto a Genova, ha messo in evidenza che il 70% dei tumori maligni delle cagne sono localizzati alla mammella (Merlo et al., 2008).

2.2 Fattori di rischio

Il tasso di incidenza del CMT tende ad aumentare con l'età, con una frequenza maggiore tra gli 8 e i 10 anni; l'insorgenza di questa forma neoplastica appare più rara in soggetti di età inferiore ai 4 anni (Chang et al., 2005). In un studio, si riporta come l'età media di sviluppo dei tumori benigni sia di 8.5 anni, mentre quella dei tumori maligni sia pari a 9.5 anni (Sorenmo et al., 2009).

L'incidenza del CMT è maggiore in cani di **razza** pura e in soggetti di piccola taglia. In generale, alcune razze, come ad esempio il barboncino, l'English Springer Spaniel, il Brittany Spaniel, il Cocker Spaniel, il pastore tedesco, il Maltese, lo Yorkshire Terrier ed il bassotto risultano quelle maggiormente rappresentate negli studi riguardanti le

neoplasie mammarie (Sleeckx et al., 2011; Sorenmo et al., 2011). Attualmente, tuttavia, non è stata dimostrata alcuna causa genetica o familiare nello sviluppo del CMT.

Notevole rilevanza è attribuita, invece, agli **ormoni sessuali** ed in particolare, agli steroidi ovarici, come l'estrogeno (ER) e il progesterone (PR), che sembrerebbero giocare un ruolo cruciale nell'insorgenza e nella crescita del CMT (Sleeckx et al., 2011; Sorenmo et al., 2011).

Questo dato è dimostrato dal fatto che l'incidenza dei tumori mammari benigni e maligni è fortemente ridotta nei cani giovani sottoposti ad ovario-isterectomia. Infatti, le cagne sterilizzate prima del primo calore hanno un rischio di sviluppare una neoplasia mammaria pari allo 0,05%, mentre lo stesso aumenta sino all'8% se l'ovariectomia viene eseguita tra il primo e il secondo calore. Tale rischio raggiunge il 26%, nel caso in cui la sterilizzazione sia eseguita dopo il secondo calore. Non viene, invece, riscontrato alcun effetto protettivo quando la sterilizzazione viene effettuata nelle fasi successive della vita riproduttiva dell'animale (Sleeckx et al., 2011; Sorenmo et al., 2011). Sebbene questo dato sia stato frequentemente riportato in letteratura, in una revisione sistematica effettuata secondo linee guida *Cochrane*, Beauvais (2012) riporta la mancanza di una standardizzazione degli studi effettuati sino ad oggi riguardo l'effetto protettivo della sterilizzazione nello sviluppo del CMT.

L'effetto che gli steroidi ovarici esercitano sulle cellule mammarie è imputabile alla loro capacità di stimolare la divisione cellulare a seguito del legame con specifici recettori. In particolare, a seguito del legame ormone-recettore si assiste ad una variazione conformazionale del recettore stesso ed alla formazione di omodimeri che determinano l'attivazione delle chinasi, il passaggio della cellula dalla fase di quiescenza (G) a quella di sintesi (S), e l'avvio del processo mitotico. In generale, l'effetto fisiologico proliferativo può creare le condizioni per uno sviluppo in senso neoplastico (Queiroga

et al., 2005). Tale condizione si ripete ad ogni ciclo estrale, rendendo il cane maggiormente suscettibile allo sviluppo di una neoplasia mammaria. In particolare, gli estrogeni determinano una crescita delle cellule dell'epitelio duttale, mentre i progestinici inducono lo sviluppo del sistema lobulo-alveolare determinando una iperplasia delle cellule epiteliali secretici e della componente mioepiteliale (Rutteman, 1990; Stovring et al., 1997; Queiroga et al., 2005).

Il meccanismo d'azione con cui il progesterone determina i suoi effetti proliferativi è ulteriormente potenziato dalla produzione locale di ormone della crescita (GH), di prolattina e del fattore di crescita insulino-simile (insulin-like growth factor-1, IGF-1) (Mol et al., 1999; Queiroga et al., 2008). Dall'altra parte, in altri studi si dimostra che quest'ormone è in grado di diminuire la proliferazione cellulare indotta dagli estrogeni (Foidart et al., 1998; Kaaks et al., 2005). Questi dati, apparentemente in antitesi, possono essere spiegati dalla scoperta che diversi metaboliti derivati dal progesterone agiscono come ormoni indipendenti e con azioni opposte sul ciclo cellulare, sull'apoptosi e sull'interazione con molecole citoscheletriche e di adesione. Come dimostrato da Wiebe (2006), infatti, il 5α -diidrossiprogestosterone (5α HP), metabolita del PR, promuove il processo metastatico stimolando la proliferazione cellulare (Wiebe, 2006).

Nel cancro al seno della donna, gli ormoni steroidei assumono un'importanza sia da un punto di vista prognostico che terapeutico (Yeh & Mies, 2008). Al pari di quanto riportato in medicina umana, i recettori per l'ER e per il PR nel cane sono espressi sia nel tessuto mammario sano sia in quello neoplastico. Numerosi autori hanno riportato una perdita dell'espressione recettoriale all'aumentare del grado di malignità delle neoplasie mammarie del cane (Chang et al., 2005; De Las Mulas et al., 2005; Millanta et al., 2005; Sleenckx et al., 2011). Diversi studi hanno, inoltre, cercato di correlare i

diversi livelli di espressione dei recettori ormonali con la prognosi del CMT e soprattutto con i tempi di sopravvivenza del cane. Sebbene alcuni autori abbiano riportato un'associazione tra la perdita di espressione dei recettori per l'ER/PR ed un ridotto tempo di sopravvivenza (Nieto et al., 2000; De Las Mulas et al., 2005, Gama et al., 2008; Chang et al., 2009), altri non hanno riscontrato l'esistenza di tale relazione (Millanta et al., 2005).

Ad oggi, quindi, non esistono sufficienti prove sul significato dello status ormonale delle neoplasie mammarie nel cane, per cui, l'applicazione di questi marcatori a scopo prognostico rimane una questione dibattuta e ancora irrisolta. Questo dato appare ulteriormente avvalorato dal fatto che ulteriori aspetti patologici e/o patofisiologici, come la pseudogavidanza, in grado di determinare irregolarità del ciclo estrale e conseguenti fluttuazioni dei livelli ormonali, non sembrano influenzare il rischio di insorgenza del CMT (Gobello, 2001).

L'inibizione del recettore estrogenico attraverso una terapia endocrina, sia direttamente utilizzando antagonisti degli estrogeni o indirettamente bloccando la conversione di androgeni in estrogeni (inibitori dell'aromatasi), costituisce il cardine della terapia adiuvante del cancro al seno ER/PR positivo della donna (Den Hollander et al., 2013). Nei cani, attualmente non esistono dati sufficienti che dimostrino l'efficacia dei trattamenti ormonali. Infatti, anche se Sartin (1993) ha dimostrato l'efficacia del modulatore selettivo *Tamoxifene* nell'inibire l'azione dei recettori estrogenici in linee cellulari mammarie neoplastiche, l'utilizzazione di questo farmaco nel CMT non è consentita considerando gli effetti collaterali estrogeno-simili del trattamento nel cane (Tavares et al., 2010).

Diversi studi hanno valutato l'effetto dei componenti della **dieta** e dell'**obesità** sul rischio di sviluppo del cancro al seno della donna (Cleary et al., 2010; Turner, 2011) e

dei tumori mammari nel cane (Shofer et al., 1989; Sonnenschein et al., 1991; Perez Alenza et al., 1998). L'obesità ed una dieta ricca di grassi sono correlati con lo sviluppo di neoplasie mammarie nella donna verosimilmente a causa di un aumento del livello di estrogeni circolanti. Anche nei cani, l'obesità ad 1 anno di età, l'assunzione di una alimentazione casalinga a base di carni rosse rispetto a quella commerciale sono parametri significativamente associati allo sviluppo del CMT (Perez Alenza et al., 1998). In letteratura, sono presenti diversi studi che hanno investigato possibili relazioni tra l'esposizione a **contaminanti ambientali**, soprattutto con effetti estrogenici, ed il rischio di cancro al seno della donna (Weyandt et al., 2008). In un recente studio nel cane, si è osservata la presenza d'insetticidi piretroidi nel tessuto adiposo alla periferia di alcuni carcinomi mammari. Questo riscontro, pur facendo supporre un possibile coinvolgimento dei contaminanti ambientali nello sviluppo del CMT, richiede ulteriori conferme (Andrade et al., 2010).

2.3 Anamnesi e segni clinici

Nel cane adulto sono presenti 5 paia di mammelle disposte in due file parallele, anche se saltuariamente si possono riscontrare 4 o 6 paia, e distinte in toraciche craniali e caudali (M1 e M2), addominali craniali e caudali (M3 e M4) ed inguinali (M5) (Sorenmo, 2011). Tutte le mammelle possono sviluppare tumore e nello stesso animale è possibile riscontrare la presenza di più neoplasie, sia benigne che maligne.

Circa il 70% dei CMT è localizzato nelle mammelle addominali (M4) ed inguinali (M5), in relazione al fatto che in queste sedi è presente un maggior contenuto di tessuto ghiandolare (Sorenmo, 2011).

I CMT si presentano alla visita clinica come noduli singoli o multipli, delle dimensioni variabili da pochi millimetri fino a 10-20 cm (Lana et al., 2007; Sorenmo et al., 2011). I

tumori benigni appaiono solitamente di dimensioni ridotte, ben circoscritti e di consistenza soda, a differenza di quelli maligni che sono generalmente di dimensioni maggiori, a rapida crescita, scarsamente definiti, adesi ai tessuti sottostanti ed ulcerati sulla superficie cutanea (Lana et al., 2007).

Nella diagnosi di CMT è fondamentale un'accurata anamnesi prossima e remota che valuti la storia clinica del paziente in relazione allo status ormonale, alla durata dei segni clinici e dei cicli riproduttivi o all'utilizzo di terapie progestiniche (Lana et al., 2007; Sleenckx et al., 2011, Sorenmo et al., 2011).

Durante la visita clinica è necessaria, accanto alla valutazione delle dimensioni del tumore, un'accurata valutazione dei linfonodi inguinali superficiali ed ascellari al fine di verificare la presenza di linfadenomegalia quale indicatore di metastasi linfonodali (Lana et al., 2007; Sleenckx et al., 2011; Sorenmo et al., 2011).

Se sono presenti metastasi, i cani possono mostrare sintomi aspecifici quali affaticamento, letargia, perdita di peso, dispnea, tosse, linfedema o zoppia. L'entità e la posizione delle metastasi determinano la gravità dei segni clinici (Lana et al., 2007; Sleenckx et al., 2011; Sorenmo et al., 2011). Anche se i carcinomi metastatizzano principalmente attraverso i vasi linfatici ai linfonodi regionali ed ai polmoni, viene descritta, in letteratura, anche una diffusione ematogena al fegato, alle ossa, al cervello, alla milza, ai reni, alla cute, all'occhio, alle ghiandole surrenali, all'utero, al cuore, ai muscoli e al pancreas (Misdorp, 2002; Lana et al., 2007; Sleenckx et al., 2011). L'iter diagnostico può comprendere una prima valutazione citologica della neoplasia mammaria e dei linfonodi tributari. La citologia mammaria è stata, spesso, considerata un esame scarsamente attendibile vista l'elevata eterogeneità morfologica delle componenti neoplastiche (Griffiths et al., 1984; Allen et al., 1986). Tuttavia, recentemente, numerosi autori hanno dimostrato come questo esame, poco costoso e

facilmente eseguibile, costituisca un utile strumento diagnostico per distinguere le lesioni neoplastiche da quelle infiammatorie (Simeonov & Simeonova, 2006; Cassali et al., 2007; Simon et al., 2009; Shafiee et al., 2013). In particolare, nel CMT, l'esame citologico comparato all'esame istologico mostra un'accuratezza diagnostica pari al 67,5%, con una sensibilità e specificità, rispettivamente, dell'88% e del 96% (Simon et al., 2009). Tuttavia, l'esame citologico delle neoformazioni mammarie non consente, pur mostrando elevati livelli di accuratezza diagnostica, una valutazione del grado di invasione delle cellule neoplastiche nella componente stromale. Per tale motivo l'esame istologico rimane il gold standard nella diagnosi delle neoplasie mammarie del cane (Sorenmo, 2003).

Accanto a questi esami, è necessaria una valutazione radiografica del torace ed ecografica dell'addome per valutare la presenza di lesioni metastatiche a distanza (Lana et al., 2007; Sleenckx et al., 2011). Le lesioni metastatiche al polmone appaiono, solitamente, radiodense, ben definite, circolari e disseminate nel parenchima. Tuttavia, è importante ricordare che la tecnica radiografica è poco sensibile nell'individuare le metastasi polmonari potendo evidenziare solamente quelle di dimensioni superiori ai 5-7 mm (Sleenckx et al., 2011). In quest'ottica, accanto ai sistemi convenzionali di diagnostica per immagine, sono state ultimamente prese in considerazione per la diagnosi dei CMT la mammografia e la tomografia computerizzata, tecniche queste comunemente impiegate in medicina umana (Otoni et al., 2010, Mohammed et al., 2011). In particolare, l'utilizzo della tecnica mammografica su tessuti mammari del cane ha consentito, in una recente ricerca, di diagnosticare delle lesioni iperplastiche non palpabili nel cane, aprendo così la strada ad un sistema di imaging del tutto innovativo in grado di identificare ed, eventualmente, di seguire l'evoluzione di queste lesioni proliferative verso forme tumorali invasive (Mohammed et al., 2011).

2.4 Sistemi di classificazione istologica

L'esame istopatologico è la tecnica di elezione nella diagnosi e nella classificazione delle neoplasie mammarie del cane.

Nel corso degli anni si sono susseguiti differenti sistemi di classificazione istologica delle lesioni mammarie del cane, inizialmente adattate ai sistemi utilizzati in medicina umana (Hampe & Misdorp, 1974).

L'attuale classificazione, nota come *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat* pubblicata dalla World Health Organization (WHO) nel 1999, associa i pattern tissutali istologici con i dati di follow-up, assegnando ai diversi istotipi dei comportamenti biologici specifici (Misdorp et al., 1999; Misdorp, 2002). La classificazione WHO suddivide le neoplasie mammarie del cane in forme benigne e maligne di tipo epiteliale, mesenchimale e misto, queste ultime, caratterizzate dalla proliferazione di elementi epiteliali e mesenchimali (Tabella 2.1). Le neoplasie epiteliali vengono ulteriormente suddivise in forme semplici, ovvero composte da un unico tipo cellulare (cellule epiteliali luminali o mioepiteliali), e complesse, caratterizzate dalla proliferazione di entrambe le componenti.

Sebbene la differenziazione tra le neoplasie maligne e quelle benigne sia basata su numerosi criteri ormai associati quali la crescita infiltrativa, la presenza di necrosi, l'elevato indice mitotico ed il pleomorfismo cellulare e nucleare, si stima che l'errore diagnostico tra le due forme sia pari al 10% (Misdorp, 2002). In generale, utilizzando la classificazione WHO, il rapporto tra neoplasie benigne e maligne è all'incirca paritario, attestandosi su valori compresi tra il 40% ed il 60% a favore delle forme maligne.

Tabella 2.1. *Classificazione istologica delle neoplasie mammarie del cane secondo la WHO Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat (modificata da Misdorp et al., 1999).*

Tumori benigni	Adenoma
	✓ Semplice
	✓ Complesso
	✓ Basaloide
Tumori maligni	Fibroadenoma
	✓ a bassa cellularità
	✓ ad alta cellularità
	Tumore misto benigno
Iperplasie/Displasie mammarie	Papilloma intraduttale
	Carcinoma <i>in situ</i>
	Carcinoma complesso
	Carcinoma semplice
	✓ Tubulopapillare
	✓ Solido
	✓ Anaplastico
	Tipi speciali di carcinoma
	✓ Carcinoma a cellule fusate
	✓ Carcinoma a cellule squamose
	✓ Carcinoma mucinoso
	✓ Carcinoma con cellule ricche in lipidi (lipid-rich)
	Sarcomi
	✓ Fibrosarcoma
✓ Osteosarcoma	
✓ Altri sarcomi	
Carcinosarcoma	
Carcinoma o sarcoma in tumore benigno	
Iperplasie/Displasie mammarie	Iperplasia duttale
	Iperplasia lobulare
	✓ Epiteliale
	✓ Adenosi
	Cisti
	Ectasia duttale
	Fibrosi focale (fibrosclerosi)
Ginecomastia	

Il sistema di classificazione istopatologica WHO, come accennato in precedenza, attribuisce alle diverse forme neoplastiche un comportamento biologico specifico (Misdorp, 2002). In particolare, in letteratura, si riporta che il tempo di sopravvivenza

dei cani con un sarcoma sia inferiore a quelli affetti da carcinoma a 2 anni dall'intervento chirurgico.

All'interno dei carcinomi semplici, le forme anaplastiche mostrano una prognosi sfavorevole seguite, in ordine decrescente di malignità, dalle forme solide, tubulopapillari e dalle forme di carcinoma *in situ* (Philibert et al., 2003).

Al contrario, i carcinomi complessi risultano essere meno aggressivi e consentono tempi di sopravvivenza superiori (Misdorp et al., 1999; Chang et al., 2005; Karayannopoulou et al., 2005).

2.5 Grading dei carcinomi mammari

I carcinomi mammari vengono ulteriormente classificati secondo il grado istologico di malignità. In letteratura veterinaria, sono stati proposti vari sistemi di *grading* per il cane che valutano, analogamente a quelli impiegati in medicina umana, la percentuale di formazione dei tubuli, l'attività mitotica ed il pleomorfismo nucleare.

In particolare, ad ognuno di questi parametri viene assegnato un punteggio compreso tra i valori 1 e 3. La somma dei punteggi consente di classificare i carcinomi in tre gradi: ben differenziato o grado I (punteggio 3-5), moderatamente differenziato o grado II (punteggio 6-7) e scarsamente differenziato o grado III (punteggio 8-9).

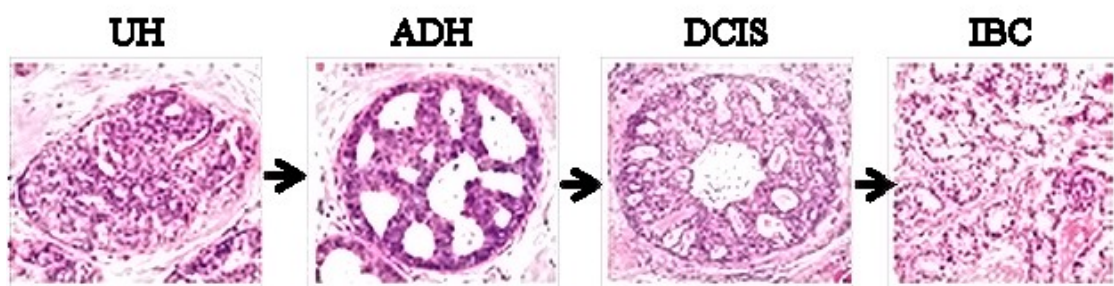
Nei cani affetti da carcinoma mammario, il grading istopatologico viene messo in relazione, come dimostrato da Karayannopoulou (2005), con il tempo di sopravvivenza post-operatoria. In particolare, i cani affetti da carcinomi scarsamente differenziati (grado III) tendono ad avere un tempo di sopravvivenza notevolmente inferiore rispetto ai cani affetti da neoplasie di I e II grado (Karayannopoulou et al., 2005; Goldschmidt et al., 2011).

2.6 Lesioni iperplastiche mammarie

Accanto alle forme neoplastiche, la classificazione WHO descrive anche le lesioni iperplastiche e displastiche che si possono riscontrare nella mammella della cagna (Misdorp et al., 1999).

Nella donna, questa tipologia di lesioni, ed in particolare, l'iperplasia duttale, nella sua forma tipica (UH) ed atipica (ADH) giocano un ruolo cruciale nella progressione neoplastica verso forme invasive. S'ipotizza, infatti, che nel determinismo dei tumori al seno della donna esista una sorta di evoluzione graduale a partire dalle lesioni definite *preneoplastiche* (UH e ADH) e *preinvasive*, come il carcinoma duttale *in situ* (DCIS) verso lo sviluppo di un carcinoma invasivo (IBC) (Figura 2.1) (Reis & Lakhani, 2003; Hartmann et al., 2005; Vargo-Gogola & Rosen, 2007; Ellis, 2010; Lopez-Garcia et al., 2010)

Figura 2.1. *Ipotesi di progressione delle lesioni mammarie preneoplastiche (UH e ADH) e preinvasive (DCIS) verso lesioni neoplastiche invasive (IBC) (modificata da Lopez-Garcia et al., 2010)*



Anche in medicina veterinaria, diversi autori hanno riportato l'esistenza di lesioni preneoplastiche e preinvasive nella mammella della cagna (Antuofermo et al., 2007; Stratmann et al., 2008; Sorenmo et al., 2009; Ferreira et al., 2010; Mouser et al., 2010; Sleenckx et al., 2011).

Secondo Antuofermo (2007) e Mouser (2010), l'iperplasia duttale viene diagnosticata quando si assiste al parziale riempimento del dotto ghiandolare da parte di una

popolazione mista di cellule epiteliali e mioepiteliali con scarse atipie cellulari. La diagnosi d'iperplasia duttale atipica (ADH) è emessa quando si assiste ad una proliferazione mista di cellule epiteliali e mioepiteliali mostranti atipie cellulari e/o nucleari. Il carcinoma duttale *in situ* (DCIS) è caratterizzato, invece, da una proliferazione di cellule neoplastiche epiteliali maligne mostranti vari gradi di atipia cellulare ed architetturale e confinata entro la membrana basale, senza evidenti segni di invasione dei tessuti vicini. Il carcinoma duttale *in situ* viene ulteriormente classificato, in base alle caratteristiche citologiche e strutturali, in DCIS a basso, intermedio ed alto grado. Anche nel cane, così come nella donna, queste lesioni vengono considerate dei fattori di rischio per lo sviluppo di forme neoplastiche di tipo invasivo nella mammella (Sleeckx et al., 2011).

2.7 Stadiazione clinica

In ambito clinico, assume notevole importanza la stadiazione clinica del paziente affetto da neoplasia mammaria.

Sono stati pubblicati due diversi sistemi per stadiare le neoplasie mammarie del cane, uno proposto nel 1980 dalla World Health Organization (WHO) e una versione WHO-modificata solo recentemente (Owens, 1980; Lana et al., 2007).

Entrambi i sistemi considerano le dimensioni del tumore primario (T), l'interessamento dei linfonodi regionali (N) (confermato con esame citologico o istopatologico) e la presenza di metastasi sistemiche (M) (Tabella 2.2).

Tabella 2.2. *Stadiazione clinica dei tumori mammari del cane (modificata da Lana et al., 2007)*

T: Tumore primario	
T1 diametro <3 cm	Stadio clinico
T2 diametro tra 3 e 5 cm	I T1 N0 M0
T3 diametro >5 cm	II T2 N0 M0
N: Stato dei linfonodi tributari	III T3 N0 M0
N0 nessuna metastasi	IV Tn* N1 M0
N1 metastasi	V Tn* Nn [#] M1
M: Metastasi sistemiche	
M0 nessuna metastasi	
M1 metastasi	

*Tn= qualsiasi diametro; [#]Nn= sia N0 che N1

L'impiego di questo sistema consente una raccolta standardizzata e accurata dei dati clinici e fornisce delle importanti informazioni prognostiche necessarie ai fini di una corretta programmazione terapeutica. La maggior parte degli studi effettuati sui CMT che identificano come elementi prognostici le dimensioni del tumore, il coinvolgimento linfonodale e lo staging clinico sono sostanzialmente convincenti, pur non essendo conformi con quanto stabilito dall'*American College of Veterinary Pathologists Oncology* (Sorenmo et al., 2011).

La dimensione del tumore consente, infatti, di prevedere i tempi medi di sopravvivenza dei cani affetti da neoplasie mammarie maligne. In particolare, secondo quanto riportato da Philibert (2003), i cani con neoplasie mammarie di diametro superiore ai 3 cm mostrano un tempo medio di sopravvivenza di 14 mesi, rispetto ai 22 mesi dei cani con CMT inferiore a 3 cm. Inoltre, una dimensione maggiore di 3 cm è associata ad indicatori prognostici sfavorevoli, quali l'indice di proliferazione cellulare ed il riscontro di metastasi linfonodali (Chang et al., 2005; Sorenmo et al., 2009).

Il coinvolgimento linfonodale e la presenza di metastasi a distanza sono considerati dei parametri prognostici altamente predittivi anche in analisi univariate. Infatti, come riportato da Karayannopoulou (2005), in uno studio che considerava il tasso di mortalità in cani con neoplasie mammarie maligne, l'86% dei soggetti con metastasi linfonodali veniva a morte entro i 2 anni di follow-up, mentre l'84% dei soggetti senza metastasi riusciva a sopravvivere alla malattia. I cani con metastasi linfonodali mostrano, inoltre, un tempo di sopravvivenza post-operatorio notevolmente inferiore (5 mesi) se comparato con un tempo medio di sopravvivenza dei cani con CMT in assenza di coinvolgimento linfonodale (28 mesi) (Philibert et al., 2003).

2.8 Terapia

L'approccio chirurgico rappresenta il trattamento di elezione per tutte le neoplasie mammarie del cane, ad eccezione del carcinoma infiammatorio e delle neoplasie metastatiche (Misdorp, 2002; Lana et al., 2007). Considerando, inoltre, l'esistenza di una possibile trasformazione neoplastica delle forme benigne in maligne, qualsiasi neoformazione mammaria dovrebbe essere asportata chirurgicamente (Sorenmo et al., 2009). L'exeresi chirurgica consente la diagnosi istologica e può essere risolutiva se i margini chirurgici non presentano infiltrazione di cellule neoplastiche e se la neoplasia non ha raggiunto uno stadio metastatico (Hedlund, 2002). In generale, la chirurgia è curativa per le neoformazioni benigne, mentre circa il 50% dei tumori maligni mostra, al momento dell'intervento, micrometastasi che possono comunque portare alla morte del soggetto (Misdorp, 2002). Il tipo di chirurgia dipende sostanzialmente dall'estensione della neoplasia, dalla localizzazione e dallo status clinico del paziente (Hedlund, 2002):

- ✓ *Nodulectomia*: è una procedura chirurgica indicata per piccoli noduli (minori di 0,5 cm), superficiali, non adesi ai piani sottostanti e non invasivi. In questa procedura, dopo aver inciso la cute, si asporta il nodulo che poi viene sottoposto ad esame istologico. I margini di escissione chirurgica nel caso di formazioni benigne sono di 1-3 cm, mentre se l'aspetto istologico indica una malignità allora è necessaria una revisione chirurgica della neoformazione.
- ✓ *Mammectomia*: l'asportazione di una ghiandola è indicata per le lesioni che si trovano in posizione centrale all'interno della ghiandola stessa, con dimensioni superiori al centimetro ed adese alla cute sottostante. In questo caso dovrà essere asportata anche la fascia sottocutanea. Qualora la neoformazione sia localizzata tra due unità ghiandolari, allora si dovrà asportare anche la ghiandola non direttamente interessata dalla neoformazione (M4-M5); al contrario, se la neoformazione è localizzata in un'unica ghiandola, allora si asporterà la singola unità. Molto spesso si preferisce asportare, in relazione al drenaggio linfatico, le prime tre ghiandole (M1-M3) o le ultime due (M4-M5) assieme al linfonodo inguinale (*mastectomia regionale*). Al contrario, il linfonodo ascellare viene rimosso solo se aumentato di volume oppure se citologicamente metastatico.
- ✓ *Mastectomia unilaterale o bilaterale*: la mastectomia uni o bilaterale viene considerata quando sono presenti neoplasie multiple. In caso d'interessamento bilaterale viene, solitamente, rimossa la singola linea mammaria e successivamente viene asportata l'altra.

La letteratura ha, spesso, prodotto dei risultati contraddittori sull'esigenza di effettuare l'ovarioisterectomia contemporaneamente alla mastectomia (Schneider et al., 1969; Sorenmo et al., 2000). In particolare, numerosi autori hanno più volte riportato una mancanza di associazione tra il tempo di sopravvivenza e la gonadectomia al momento

della mastectomia. Recentemente, tuttavia Sonremo (2000) e collaboratori hanno riportato un aumento del tempo di sopravvivenza in cani in cui l'ovarioisterectomia veniva effettuata meno di due anni prima dalla mastectomia.

3. Marcatori tumorali nelle neoplasie mammarie del cane

3.1 Definizione di marcatore tumorale

Con il termine di *marcatore biologico* si intende, secondo la National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group, una “caratteristica che può essere oggettivamente misurata e valutata come un indicatore dei normali processi biologici, dei processi patologici e delle risposte farmacologiche in seguito ad interventi terapeutici” (Atkinson et al., 2001; Buyse et al., 2010).

Secondo la stessa fonte letteraria, un *marcatore tumorale* può essere definito come una “molecola biologica presente nel sangue, nei liquidi corporei o nei tessuti in grado di definire un processo come fisiologico oppure patologico e di valutare la risposta biologica ad un trattamento farmacologico” (Atkinson et al., 2001).

In accordo con questa definizione si può, quindi, considerare come potenziale *marcatore tumorale* qualsiasi parametro in grado di consentire la diagnosi di una neoplasia o di misurare, oggettivamente, i progressi di una patologia o l’effetto di una cura farmacologica (Chatterjee et al., 2005; Mishra & Verma, 2010).

I *marcatori tumorali* possono essere rappresentati da variazioni nella sequenza di DNA, da pattern di espressione di mRNA, da trascritti aberranti, da proteine o da metaboliti che sono prodotti dal tumore stesso o dai tessuti in risposta alla presenza di una neoplasia (Kulasingam & Diamandis, 2008; Kocevcar et al., 2013).

Nella ricerca medica, i marcatori tumorali possono essere distinti in:

- ✓ *Diagnostici*: in grado di rilevare ed identificare una particolare tipologia di neoplasia (marcatori di differenziazione cellulare) e/o discriminare tra tessuto neoplastico e tessuto sano.

- ✓ *Prognostici*: utilizzati per prevedere il decorso e la probabilità di sviluppo di recidive della patologia.
- ✓ *Predittivi*: in grado di prevedere la risposta al trattamento prima che lo stesso abbia inizio, stratificano i pazienti in responsivi o non responsivi alle terapie farmacologiche.
- ✓ *Farmacologici/farmacodinamici (terapeutici)*: in grado di individuare la terapia farmacologica più efficace e il dosaggio dell'agente da utilizzare
- ✓ *Di screening*: utilizzati per valutare il rischio di sviluppo di una patologia neoplastica in soggetti sani (Kulasingam & Diamandis, 2008; Buyse et al., 2010; Kocevcar et al., 2013).

Da queste brevi considerazioni emerge come la scoperta di nuovi marcatori tumorali, così come la validazione degli stessi, rappresenti un punto cruciale sia nella pratica clinica sia nell'acquisizione d'informazioni necessarie alla comprensione dei meccanismi carcinogenetici.

3.2 Marcatori diagnostici e prognostici nelle neoplasie mammarie del cane

Marcatori diagnostici

Come precedentemente accennato, i marcatori diagnostici consentono di rilevare ed identificare una particolare tipologia di neoplasia e/o discriminare tra tessuto tumorale e tessuto sano. Sulla base dell'espressione di diversi determinanti antigenici, come le citocheratine (CK), la caderina P, la P63, l' α -actina della muscolatura liscia (SMA) e la calponina, nel tessuto ghiandolare mammario non neoplastico, si possono riconoscere:

- ✓ cellule epiteliali luminali
- ✓ cellule mioepiteliali basali

Le *citocheratine* (CK) sono proteine dei filamenti intermedi espresse dalle cellule epiteliali, compongono il citoscheletro e sono indispensabili per la struttura e la funzione del tessuto normale (Schweizer et al., 2008).

La famiglia delle citocheratine è costituita da 54 elementi, classificati in relazione al punto isoelettrico in tipo I o acide (CK9-10, CK12-28 e CK31-40) ed in tipo II o neutre/basiche (CK1-8 e CK71-86) o in relazione al peso molecolare in CK ad alto (CK 5/6) e basso peso molecolare (CK 18/19) (Moll et al., 2008; Schweizer et al., 2008).

La maggior parte delle CK, studiate nella ghiandola mammaria della donna e del cane, ha dimostrato una differente espressione nello strato epiteliale luminale (positivo per CK7/CK8/CK18/CK19) rispetto a quello basale/mioepiteliale (positivo per CK5/CK14/CK17) (Griffey et al., 1993; Bocker et al., 2002; El-Rehim et al., 2004). La stabilità dei filamenti intermedi permette, oltre a caratterizzare le componenti epiteliali nella mammella sana, di differenziare i vari istotipi coinvolti nelle forme neoplastiche mammarie. Infatti, in relazione ai pattern di espressione delle varie CK, i carcinomi mammari della donna possono essere classificati in basali o luminali (El-Rehim et al., 2004). Questo tipo di classificazione, come dimostrato da numerosi autori, assume rilevanza prognostica ed il fenotipo basale viene generalmente associato ad una prognosi sfavorevole (Van de Rijn et al., 2002; El-Rehim et al., 2004).

Nei tumori mammari del cane è stato descritto un fenotipo basale basato sull'espressione della CK14, caratterizzato da un comportamento clinico aggressivo (Griffey et al., 1993). Recentemente, diversi autori hanno riportato l'esistenza del fenotipo basale nel CMT dimostrandone, talvolta, l'associazione con fattori prognostici indicativi di un comportamento aggressivo della neoplasia (Sassi et al., 2010; Beha et al., 2012).

La *P-caderina* appartiene alla famiglia delle caderine assieme alla caderine epiteliali (E-caderina) e a quelle neurali (N-caderina). Le caderine sono molecole di adesione cellulari calcio-dipendenti che svolgono un ruolo cruciale durante lo sviluppo embrionale e nel mantenimento della normale architettura tissutale (Gumbiner, 1996). Nel tessuto ghiandolare mammario, la P-caderina è espressa esclusivamente dalle cellule mioepiteliali e rappresenta un marcatore altamente specifico per questo fenotipo cellulare (Gama et al., 2004; Gama & Schmitt, 2012). Nel carcinoma al seno della donna, l'espressione della P-caderina è spesso associata ad un comportamento biologico aggressivo e ad una prognosi infausta (Paredes et al., 2002, Paredes et al., 2007). In maniera differente nel CMT, l'espressione della P-caderina, pur essendo associata ai carcinomi invasivi, non è considerata un marcatore prognostico (Gama et al., 2004; Gama & Schmitt, 2012).

La *P63* è un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia della proteina oncosoppressiva P53 (Yang et al., 1998; Kaelin, 1999; Little & Jochemsen, 2002). Nonostante la sua omologia con *p53*, il gene *p63* codifica almeno sei differenti proteine, distinte in due classi: una contenente una regione simile al dominio di transattivazione della P53 (isoforma TAp63) e un altro privo di questo dominio (isoforma Δ Np63) (Yang et al., 1998).

La P63, a differenza della P53, è raramente mutata nelle forme neoplastiche, tuttavia numerosi autori descrivono un'aumentata espressione di questa proteina in alcuni sottotipi di carcinomi dell'uomo, suggerendo un possibile ruolo come oncoproteina (Osada et al., 1998; Massion et al., 2003). A supporto di questa ipotesi, è stato dimostrato che un'alterazione dell'isoforma TAp63 predispone allo sviluppo e alla progressione tumorale (Koster et al., 2006).

La P63, nel cane così come nella donna, rappresenta un marcatore altamente sensibile e specifico per le cellule mioepiteliali mammarie (Barbareschi et al., 2001) e la sua espressione è considerata un parametro diagnostico in grado di differenziare le forme carcinomatose dei CMT che si sviluppano nel contesto di tumori benigni (Gama et al., 2003; Ramalho et al., 2006; Bertagnolli et al., 2009).

Le cellule mioepiteliali, inoltre, avendo proprietà contrattili esprimono *l'α-actina della muscolatura liscia (SMA)* e la *calponina*, che tuttavia, essendo espresse anche da altri tipi cellulari come le cellule della muscolatura liscia e i miofibroblasti, sono considerate dei marcatori meno specifici (Espinosa de los Monteros et al., 2002; Ramalho et al., 2006; Bertagnolli et al., 2009).

Marcatori prognostici

Anche in medicina veterinaria, la ricerca di marcatori prognostici ha assunto un ruolo cruciale nello studio delle forme neoplastiche (Zaidan Dagli, 2008). Tuttavia, a differenza di quanto osservato nel cancro al seno della donna, dove numerosi studi hanno attribuito un ruolo prognostico a molecole in grado di prevedere il decorso e lo sviluppo di recidive, le ricerche svolte sul CMT hanno prodotto dei risultati contraddittori e spesso inconclusivi.

Tra i marcatori prognostici maggiormente studiati nei CMT si ricordano i marcatori di proliferazione cellulare (AgNOR, PCNA, Ki-67), i recettori per gli ormoni ovarici steroidei (ER/PR), le molecole di adesione cellulare (E-caderina), i sistemi enzimatici (Ciclossigenasi) ed alcuni oncogeni.

La *proliferazione cellulare* è un processo fondamentale nella progressione tumorale e numerosi studi sui CMT hanno valutato questa proprietà come possibile fattore prognostico (Klopfleisch et al., 2010). Differenti metodologie, quale la quantificazione

di AgNOR (NOR-regioni dell'organizzatore nucleolare) (Bundgaard-Andersen et al., 2008), l'analisi immunohistochimica del PCNA (antigene di proliferazione nucleare) e della proteina nucleare Ki-67, hanno consentito di stabilire un'associazione statisticamente significativa tra la proliferazione cellulare, la malignità dei CMT ed i tempi di sopravvivenza medi dell'animale (Klopfleisch et al., 2010).

Come accennato in precedenza, i *recettori per l'estrogeno (ER) ed il progesterone (PR)* sono considerati dei fattori prognostici nel cancro al seno della donna (Yeh & Mies, 2008). I dati riportati in letteratura sul significato prognostico di questi recettori nei CMT non sono, invece, sufficienti, nonostante la dimostrata associazione tra la diminuzione di ER e/o PR ed un ridotto tempo di sopravvivenza dell'animale (Nieto et al., 2000; De Las Mulas, 2005).

Le *caderine* sono molecole di adesione cellulare calcio dipendenti che presentano un dominio extracellulare, responsabile delle interazioni cellula-cellula, un dominio transmembrana ed un dominio C-terminale che si estende nel citoplasma (Wheelock & Johnson, 2003).

Tra le varie caderine, la caderina epiteliale (E-caderina) è quella maggiormente studiata e coinvolta nei processi di tumorigenesi (Klopfleisch et al., 2010).

La E-caderina è un glicoproteina transmembrana da 120 kDa il cui dominio extracellulare promuove l'adesione cellulare, mentre il dominio intracellulare interagisce con le catenine (α -, β - e γ - catenine) che collegano le caderine all'actina citoscheletrica (Knudsen et al., 1998). Nella ghiandola mammaria non neoplastica, la E-caderina viene espressa nei margini cellulari delle cellule epitaliali duttali ed alveolari, consentendone l'adesione.

La perdita o la riduzione dell'espressione di questa glicoproteina, correlata con il grado istologico dei CMT, determina un aumento della capacità di metastatizzazione ed un

ridotto tempo di sopravvivenza nei cani affetti da questa neoplasia (De Matos et al., 2007; Gama & Schmitt, 2012).

L'enzima *Ciclossigenasi (COX)* catalizza la formazione di prostaglandine dall'acido arachidonico. Esistono due isoforme dell'enzima: una forma costitutiva nota come COX1 ed una isoforma inducibile conosciuta come COX2 (Klopfleisch et al., 2010). L'aumento dell'espressione della COX2 può essere indotta dall'ipossia, da stimoli infiammatori e da diversi oncogeni. Nelle neoplasie, le prostaglandine promuovono la resistenza all'apoptosi, la proliferazione cellulare ed una maggiore angiogenesi (Demaria et al., 2010).

Diversi studi hanno indagato l'espressione proteica delle COX nei CMT, in particolar modo della sua forma inducibile (Queiroga et al., 2007; Queiroga et al., 2010; Guimaraes, et al., 2013). Secondo queste ricerche, l'aumento dell'espressione della COX2 è correlato con lo sviluppo di metastasi e con un ridotto tempo di sopravvivenza nei cani affetti da neoplasie mammarie maligne (Queiroga et al., 2007; Queiroga et al., 2010; Klopfleisch et al., 2010; Guimaraes et al., 2013)

3.3 Tecnologie innovative per la scoperta di marcatori tumorali

Negli ultimi 30 anni si è assistito allo sviluppo di tecnologie innovative genomiche e proteomiche che hanno consentito di chiarire numerosi meccanismi alla base dello sviluppo dei tumori (Kulasingam & Diamandis, 2008; Kocevcar et al., 2013).

Molte delle scoperte più recenti in questo campo sono relazionabili all'utilizzo della tecnologia Next Generation Sequencing (NGS), che, nell'ambito della genomica funzionale, ha fornito un numero esponenziale di dati per lo studio di diverse patologie nell'uomo (Kilpinen & Dermitzakis, 2012). In quest'ottica, i numerosi studi di genomica funzionale hanno consentito di chiarire le funzioni dei geni e di identificare

aberrazioni geniche e proteiche che influenzano lo sviluppo di patologie complesse come il cancro. L'incremento esponenziale dei dati forniti da queste ricerche sulle variazioni e le mutazioni nei genomi di pazienti affetti da neoplasie ha portato alla scoperta di numerose vie molecolari e all'identificazione di diversi marcatori tumorali (Ludwig & Weinstein, 2005). Tuttavia, ad oggi, solo un limitato numero di queste molecole sono state effettivamente adottate nella pratica clinica (Chin & Gray, 2008; Whiteaker et al., 2011).

Le ragioni principali di questo insuccesso sono sostanzialmente imputabili all'elevata eterogeneità dei tumori, fattore che rende scarsamente sensibile e specifico un candidato marcatore, o alla difficoltà di implementare test analitici in grado di dimostrare l'accuratezza diagnostica del marcatore stesso (Chin & Gray, 2008; Hanash, 2011).

Accanto alle tecniche di genomica funzionale, si è assistito allo sviluppo di tecnologie proteomiche *high-throughput* in grado, cioè, di processare un notevole numero di campioni in un tempo ridotto (Kocevar et al., 2013).

L'utilizzo di questi sistemi d'identificazione proteica ha fornito una serie di informazioni necessarie per il miglioramento nelle diagnosi e nel management di un notevole numero di patologie (Ling et al., 2007). Infatti, a differenza delle ricerche effettuate sulle alterazioni geniche (DNA o mRNA), le variazioni di espressione proteica riflettono le modificazioni patologiche in maniera più accurata (Kumar et al., 2006). Diversi studi hanno dimostrato che i livelli di trascritto (mRNA) non necessariamente sono correlati con i livelli di espressione proteica, sostanzialmente a causa della presenza di modificazioni post-traduzionali in grado di influenzare l'emivita, la stabilità, l'attività ed, in ultima analisi, la quantità delle proteine (Vogel & Marcotte, 2012; Kocevar et al., 2013). Inoltre, la presenza di fenomeni di splicing alternativo dell'RNA può dar luogo alla produzione di differenti isoforme proteiche che

rendono estremamente dinamico il proteoma (Cho, 2007; Cho & Chenge, 2007; Vogel & Marcotte, 2012).

Queste caratteristiche possono essere, quindi, studiate solo a livello proteico, rendendo l'approccio proteomico più indicato per la scoperta di nuovi marcatori tumorali da applicare nella diagnosi e nel trattamento dei pazienti oncologici (Cho & Chenge, 2007; Kulasingam & Diamandis, 2008; Kocevcar et al., 2013).

Proteomica

Le cellule tumorali contengono multiple alterazioni genetiche od epigenetiche responsabili della crescita in senso maligno delle neoplasie (Majewski & Bernards, 2011). Nelle fasi iniziali del processo carcinogenetico, tali alterazioni, sono limitate ad un numero ridotto di sequenze di DNA e quindi interessano un minor numero di proteine. Tuttavia, con la progressione del processo neoplastico si assiste all'espansione clonale delle cellule tumorali, all'accumulo di alterazioni genetiche e, conseguentemente, di numerosi prodotti proteici alterati (Kocevcar et al., 2013).

Le tecnologie proteomiche in grado di rilevare in maniera accurata le alterazioni proteiche nelle varie forme neoplastiche hanno consentito di delucidare i meccanismi del processo carcinogenetico favorendo la scoperta di nuovi potenziali marcatori tumorali.

Le tecniche proteomiche classiche si basano sull'accoppiamento di *elettroforesi bidimensionale* (2-DE) e *spettrometria di massa* (MS). In una prima fase, le proteine vengono separate in due dimensioni in base al punto isoelettrico e al loro peso molecolare su gel di poliacrilammide. In seguito alla comparazione dei *pattern* dei gel elettroforetici è possibile individuare degli *spot* differenziali tra i gruppi di campioni d'interesse. Tali *spot* saranno poi escissi dal gel, sottoposti a digestione enzimatica, ed i

peptidi ottenuti saranno analizzati tramite spettrometria di massa per l'identificazione proteica. Nell'approccio tradizionale chiamato *peptide mass fingerprinting* (PMF), l'identificazione delle proteine si basa sul fatto che il pattern proteolitico di ciascuna proteina è dettato univocamente dalla sua specifica sequenza amminoacidica, e che, pertanto, risulta identificativo della proteina in esame (Pappinet al., 1993; Cottrell, 1994).

Una variante dell'approccio di *shotgun proteomics*, noto con il termine GeLC-MS/MS, prevede una separazione preliminare delle proteine in base al peso molecolare tramite un elettroforesi monodimensionale in gel contenenti Sodio Dodecil Solfato (*SDS-PAGE*), il frazionamento del gel (generalmente tra 15 e 30 bande escisse per *lane*), la digestione in gel con tripsina, e la successiva analisi in MS delle miscele peptidiche ottenute. Il proteoma totale del campione consiste quindi nella "somma" delle identificazioni ottenute dall'insieme delle bande escisse dalla *lane* corrispondente al campione stesso.

Per quanto riguarda l'analisi bioinformatica dei dati di spettrometria di massa, l'identificazione delle proteine avviene tramite comparazione degli spettri osservati sperimentalmente con spettri ottenuti *in silico* a partire da *database* contenenti le sequenze proteiche note per l'organismo analizzato. Tale comparazione viene effettuata da specifici motori di ricerca, quali Mascot e Sequest, spesso contenuti all'interno di più ampie piattaforme informatiche utilizzate per l'analisi e la rappresentazione dei dati (ad esempio, *Proteome Discoverer* e MaxQuant) (Godovac-Zimmermann & Brown, 2001; Kocevcar et al., 2013).

È, inoltre, importante notare che per alcuni degli animali oggetto di studi di *biomarker discovery* in medicina veterinaria, a tutt'oggi, non è disponibile la sequenza completa dell'intero genoma; ciò comporta la mancanza di specifici database proteici, e dunque

ostacola parzialmente l'analisi dei dati ottenuti su campioni animali in spettrometria di massa (Klopfleisch & Gruber, 2012; Ceciliani et al., 2013).

5. Obiettivi della tesi

I cani sono frequentemente interessati da tumori mammari e sono stati, recentemente, considerati come validi modelli animali per lo studio del cancro al seno della donna. In questo contesto, in medicina veterinaria, si è assistito spesso allo studio di pattern di espressione genica e proteica di molecole perfettamente note nell'uomo, non considerando l'esistenza di probabili, ed ormai certe, differenze tra le specie. Questo ha portato alla generazione di risultati tra loro estremamente contrastanti e spesso inconclusivi che non hanno consentito l'utilizzazione di queste molecole nella pratica clinica veterinaria. L'impiego, nella ricerca oncologica, di tecnologie molecolari innovative, come ad esempio la proteomica, associate alle tecniche convenzionali come l'immunoistochimica, può consentire di risolvere le varie divergenze tra gli studi e può permettere di individuare dei marcatori tumorali diagnostici, prognostici e terapeutici per i tumori mammari del cane. Questo consentirebbe di ridurre l'insorgenza e di trattare più efficacemente questa patologia, limitando quindi lo stress e tutelando il benessere degli animali.

Da queste considerazioni è nata l'esigenza di:

- ✓ Chiarire il ruolo estremamente controverso dell'oncoproteina HER2 nelle neoplasie mammarie del cane attraverso la valutazione dei pattern di espressione genica e proteica.
- ✓ Identificare nuovi marcatori tumorali nelle neoplasie mammarie del cane con tecniche di proteomica differenziale e valutarne l'espressione immunoistochimica.

5. Espressione dell'*ERBB2/HER2* nel tumore mammario del cane

5.1 Introduzione

5.1.1 Oncogeni e proto-oncogeni

Studi di biologia molecolare applicati all'oncologia, degli ultimi tre decenni, hanno dimostrato che i tumori sono malattie causate dal progressivo accumulo di mutazioni genetiche e anomalie epigenetiche all'interno della cellula (Weinstein & Joe, 2006; Chial, 2008).

Sostanzialmente, le alterazioni geniche possono interessare i proto-oncogeni, i geni oncosoppressori, i geni regolatori del processo apoptotico ed i geni coinvolti nella riparazione del DNA (Kumar et al., 2005).

I proto-oncogeni rappresentano un gruppo di geni che, se mutati, determinano la trasformazione delle cellule normali in cellule cancerose (Lodish et al., 2000a; Weinstein & Joe, 2006). Le mutazioni a carico dei proto-oncogeni sono tipicamente dominanti e la versione mutata del proto-oncogene è nota con il termine di oncogene (Pierotti et al., 2003a; Weinstein & Joe, 2006).

I proto-oncogeni codificano per proteine estremamente importanti per la normale omeostasi cellulare con funzioni di regolazione della divisione, della proliferazione e del differenziamento cellulare. Tra le principali classi di proteine codificate da questi geni si ricordano alcuni fattori di crescita (TGF α , EGF e PDGF), vari recettori (famiglia ErbB), trasduttori di segnale (RAS), fattori di trascrizione (prodotti della famiglia c-Myc, c-Myb, c-Jun e c-Fos), componenti del ciclo cellulare (Cicline chinasi dipendenti) e altre proteine coinvolte nella regolazione del processo apoptotico cellulare (Bcl-2) (Pierotti et al., 2003a; Kumar et al., 2005).

Gli oncogeni e le proteine da loro codificate (oncoproteine) rappresentano la versione alterata della loro controparte normale e promuovono la crescita cellulare in assenza dei

normali segnali mitogenici evadendo i normali meccanismi di regolazione (Weinberg, 1996; Kumar et al., 2005).

La produzione di oncoproteine nelle cellule trasformate è costitutiva, cioè non dipende da ulteriori fattori di crescita o da altri segnali esterni, per cui la loro continua e non regolata attivazione all'interno di una neoplasia consente una ininterrotta proliferazione cellulare neoplastica, capace di sfuggire a tutti i meccanismi di controllo presenti nella normale omeostasi cellulare (Weinstein & Joe, 2006).

La conversione dei proto-oncogeni ad oncogeni può sostanzialmente avvenire attraverso tre meccanismi: mutazione genica, amplificazione genica e riarrangiamenti cromosomici, schematicamente rappresentati nella Figura 5.1.

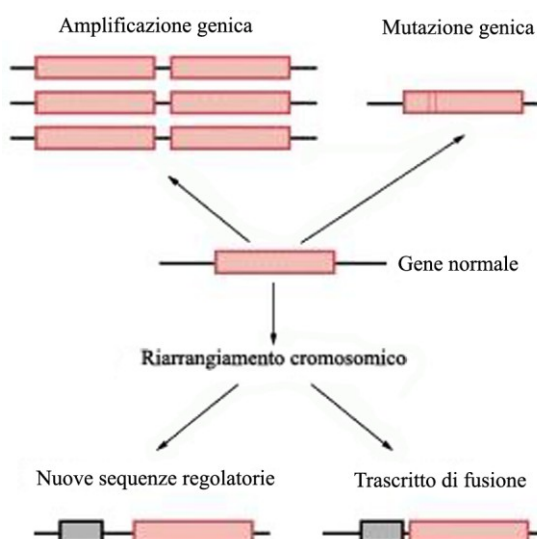
Le *mutazioni geniche*, come ad esempio la sostituzioni di basi ed i fenomeni di delezioni ed inserzioni di un nucleotide, sono capaci di convertire un proto-oncogene ad oncogene, dando luogo ad alterazioni strutturali delle proteine da loro codificate. Queste alterazioni interessano regioni geniche critiche per la regolazione delle proteine e, spesso, portano all'incontrollata e continua attività della proteina mutata. Alcuni esempi di delezioni che portano ad alterazioni strutturali nel dominio amino-terminale delle proteine si possono riscontrare nelle oncoproteine ERBB, KIT, ROS, MET e TRK (Bishop, 1991; Todd et al., 1999; Pierotti et al., 2003b).

Il processo di *amplificazione genica*, determinando un aumento del numero di copie di un gene, porta ad un aumento della sintesi di una determinata proteina conferendo un vantaggio selettivo per la crescita cellulare neoplastica. Il processo di amplificazione genica avviene attraverso la replicazione ridondante di DNA genomico dando luogo ad anomalie cariotipiche chiamate *double-minute chromosomes* (DMs) e *homogeneous staining regions* (HSRs). I DMs sono dei minicromosomi senza centromeri, mentre gli HSRs sono delle strutture cromosomiche che perdono la normale alternanza di

colorazione delle bande. Entrambi i DMs e HSRs rappresentano grandi regioni di DNA genomico amplificato contenenti fino a diverse centinaia di copie di un gene (Cowell, 1982; Storlazzi et al., 2010). L'amplificazione genica si riscontra in numerose tipologie di neoplasie frequentemente nei proto-oncogeni della famiglia *Myc*, *ERBB* e *RAS* (Pierotti et al., 2003b).

I *riarrangiamenti cromosomici*, ovvero lo spostamento fisico di una porzione di DNA da una coordinata genomica ad un'altra, vengono frequentemente riscontrati nelle neoplasie ematologiche e nei tumori solidi (Heerema, 1998; Falini & Mason, 2002). Sono rappresentati principalmente da traslocazioni cromosomiche e, meno frequentemente, da inversioni cromosomiche. I riarrangiamenti cromosomici possono generare trascritti di fusione con la formazione di proteine chimeriche oppure la sintesi di prodotti proteici a partire da nuove sequenze regolatrici appartenenti ad un altro gene (Pierotti et al., 2003b).

Figura 5.1. Rappresentazione schematica dei principali meccanismi di attivazione di un oncogene (modificato da Pierotti et al., 2003b)



I proto-oncogeni codificano, quindi, per proteine che sono coinvolte nel controllo fisiologico della crescita cellulare. Le alterazioni a carico della struttura o dell'espressione dei proto-oncogeni, con i processi precedentemente descritti, porta

all'attivazione degli oncogeni capaci di indurre uno sviluppo cellulare in senso neoplastico (Kumar et al., 2005).

Pur non esistendo una specifica classificazione, gli oncogeni, sulla base delle proprietà funzionali e biochimiche dei loro prodotti proteici, possono essere classificati in: fattori di crescita, recettori ad attività tirosin-chinasica (RTK), trasduttori del segnale, fattori di trascrizione e regolatori del processo di apoptosi (Pierotti et al., 2003b).

5.1.2 Recettori ad attività tirosin-chinasica (RTK)

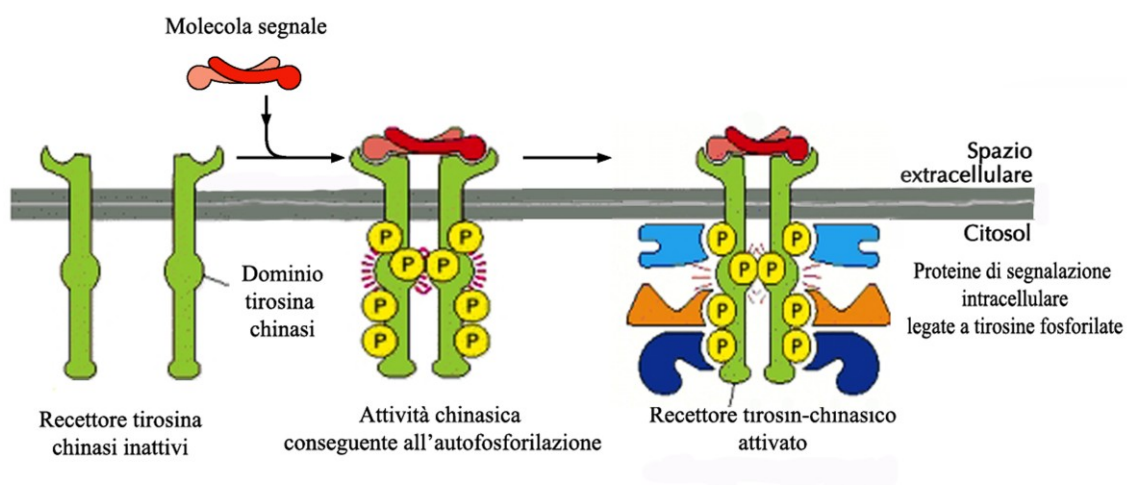
Numerosi polipeptidi (fattori di crescita, fattori di differenziamento ed ormoni) sono considerati cruciali nella proliferazione e nel differenziamento cellulare. Molti di questi elementi mediano la loro azione legandosi ed attivando specifici recettori di membrana ad attività tirosin-chinasica (RTK), spesso codificati da oncogeni, che regolano diverse funzioni nelle cellule normali e nel processo carcinogenetico (Blume-Jensen & Hunter, 2001; Gschwind et al., 2004).

La maggior parte dei RTK sono omodimeri e condividono una struttura di base costituita da una singola catena polipeptidica che attraversa una sola volta la membrana plasmatica. Dal punto di vista funzionale, questi recettori sono organizzati in diversi domini rappresentati da un dominio extracellulare contenente un sito per un ligando specifico, una singola alfa-elica idrofobica che attraversa la membrana ed un dominio intracitoplasmatico che possiede una regione ad attività chinasica.

In seguito all'interazione ligando-recettore si ha la dimerizzazione del recettore ovvero l'associazione di due molecole dello stesso. Questo legame determina l'autofosforilazione (fosforilazione reciproca) del dimero con un conseguente cambiamento conformazionale del dominio extracellulare che stabilizza le interazioni recettore-recettore.

In seguito, la fosforilazione dei residui intracitoplasmatici porta alla formazione di siti di ancoraggio che sono riconosciuti con alta affinità dai trasduttori citoplasmatici del segnale. Il legame con molecole trasduttori del segnale determina a sua volta l'innesco di una cascata molecolare che, in ultima analisi, porta a cambiamenti nella fisiologia cellulare e/o dei pattern di espressione genica (Lodish et al., 2000b) (Figura 5.2).

Figura 5.2. *Meccanismo di attivazione dei recettori tirosinchinasici (modificato da Alberts et al., 2002a)*



La versione oncogenica del recettore RTK riesce ad attivarsi, e quindi a dimerizzare, senza il legame con uno specifico ligando. Di conseguenza, il recettore mutato invia continui segnali mitogenici alla cellula che sono sufficienti a indurre una trasformazione cellulare in senso neoplastico.

5.1.4 Recettori tirosin-chinasici della famiglia ErbB

La famiglia dei recettori ErbB comprende quattro recettori, di seguito elencati, tutti ad attività tirosin-chinasica, espressi in numerosi tessuti epiteliali, mesenchimali e nervosi durante lo sviluppo embrionale e la vita adulta:

1. Recettore per il fattore di crescita epidermico ErbB-1 o EGFR (noto anche come HER1)
2. Recettore tirosin-chinasico ErbB-2 (noto anche come HER2)
3. Recettore tirosin-chinasico ErbB-3 (noto anche come HER3)
4. Recettore tirosin-chinasico ErbB-4 (noto anche come HER4) (Ullrich & Schlessinger, 1990; Bazley & Gullick, 2005; Sibilina et al., 2007; Tebbutt et al., 2013)

La famiglia dei recettori ErbB appare conservata durante l'evoluzione, come dimostrato dal ruolo di EGFR nello sviluppo fisiologico epiteliale sia dei mammiferi che degli invertebrati (Miettinen et al., 1995; Sibilina & Wagner, 1995; Sibilina et al., 2007).

Ad esempio, sia *Caenorhabditis elegans* che *Drosophila melanogaster* hanno un unico omologo EGFR, che regola, nel primo, lo sviluppo della vulva e nel secondo lo sviluppo di vari organi (Livneh et al, 1985; Aroian et al, 1990; Shilo, 2003; Bazley & Gullick, 2005). Tuttavia a differenza di quanto accade in *C. elegans*, dove è noto un solo ligando per la famiglia dei recettori ErbB, nell'uomo sono noti almeno 10 ligandi a dimostrazione della complessità del segnale attivato da queste vie (Hynes & Lane, 2005; Baselga & Swain, 2009).

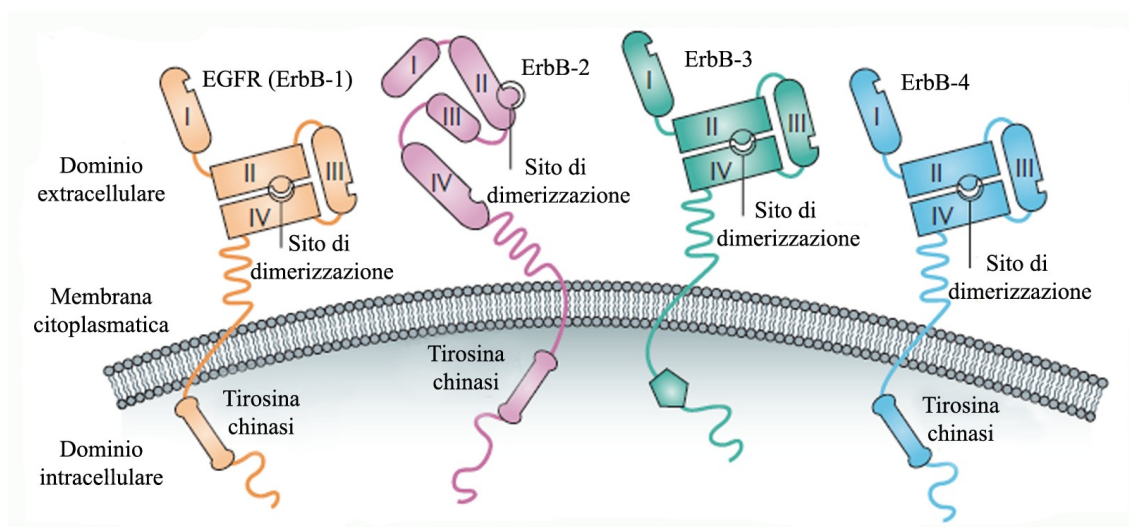
Ogni recettore ErbB comprende 3 principali domini funzionali (Figura 5.3):

1. un dominio extracellulare N-terminale glicosilato che contiene il sito di legame per il ligando specifico (~ 620 residui aminoacidici). È costituito a sua volta da quattro sub-domini (L1, S1, L2, S2 o I, II, III e IV). I domini I e III (L1 e L2)

partecipano al legame del ligando mentre le sub-unità II e IV (S1 e S2), contengono il sito di dimerizzazione.

2. un segmento transmembrana α -elica (~ 23 residui aminoacidici) associato ad un dominio juxta-membrana (~ 40 residui aminoacidici). Questa regione svolge una funzione regolatrice modulando l'internalizzazione del recettore, la sua distribuzione nelle cellule polarizzate e la sua associazione con proteine come la calmodulina (Bazley & Gullick, 2005).
3. un dominio intracellulare ad attività tirosin-chinasica (~ 260 residui aminoacidici), ed una regione regolatrice C-terminale (~ 232 residui aminoacidici)

Figura 5.3. *Struttura dei recettori ErbB (modificato da Baselga & Swain, 2009)*

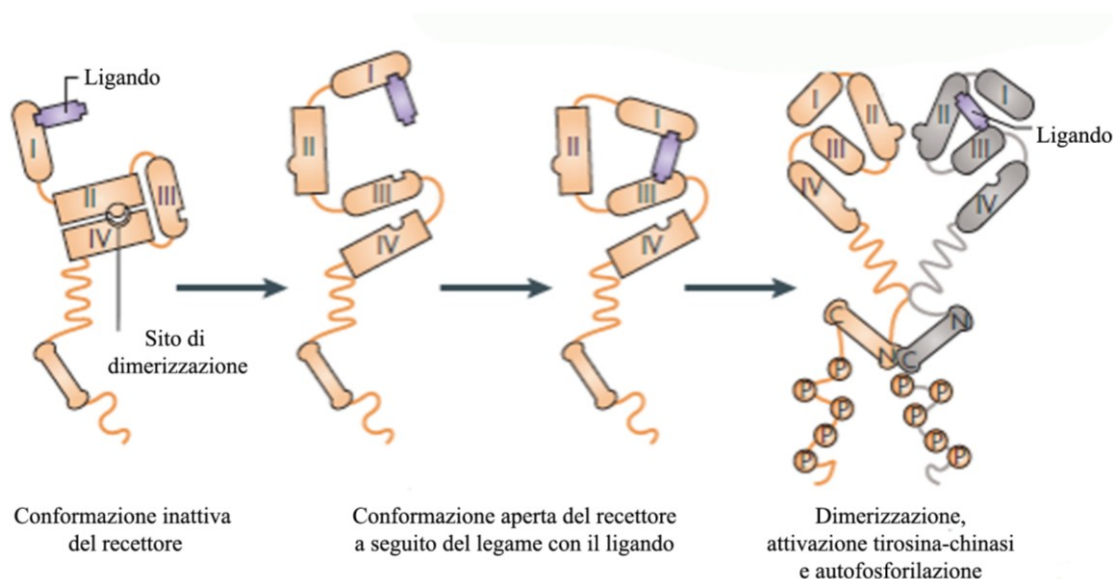


I vari recettori ErbB assumono normalmente una conformazione monomerica inattiva. Tuttavia, il legame con uno specifico ligando induce una modificazione della conformazione del recettore stesso consentendo la formazione di omodimeri (due molecole dello stesso recettore) o eterodimeri (2 molecole di recettori diversi) (Hynes & Lane, 2005; Baselga & Swain, 2009). In particolare, tale legame determina il passaggio dalla forma inattiva, caratterizzata dalla presenza d'interazioni intramolecolari tra i sub-

domini II e IV della regione extracellulare che blocca la capacità di dimerizzazione del sub-dominio II, ad una forma aperta che espone il dominio II consentendo la formazione di omo od eterodimeri (Figura 5.4) (Hynes & Lane, 2005).

La dimerizzazione o l'eterodimerizzazione tra i vari recettori stimola l'attività chinasi intrinseca degli ErbB e permette l'autofosforilazione di specifici residui di tirosina nel dominio intracitoplasmatico. Questi residui fosforilati rendono attivi e disponibili siti per le molecole intermedie coinvolte nella cascata di segnali intracellulari i quali, influenzando l'espressione genica, daranno la risposta biologica (Hynes & Lane, 2005; Baselga & Swain, 2009).

Figura 5.4. Modificazioni strutturali dei recettori ErbB in seguito al legame con un ligando (modificato Baselga & Swain, 2009)



Attualmente sono note diverse combinazioni tra i 4 recettori, sia nella forma di omo che di eterodimeri, in grado di attivare differenti cascate molecolari.

L'eterodimero formato da ErbB-2 ed ErbB-3 è considerata la più potente copia di recettori della famiglia ErbB in termini di forza d'interazione, fosforilazione dei residui di tirosina e conseguente downstream di segnali molecolari (Baselga & Swain, 2009).

I recettori ErbB sono tra loro strettamente correlati e vengono attivati tramite un legame con ligandi specifici.

I ligandi ErbB possono agire seguendo due vie: la via autocrina o la via paracrina. Mentre i ligandi ErbB paracrini sono derivati da cellule stromali, i ligandi ErbB autocrini vengono prodotti come precursori trans-membrana che vengono successivamente scissi da proteasi per essere rilasciati come ligandi solubili quando le cellule vengono stimulate (Hynes & Lane, 2005).

Attualmente, sono noti almeno 10 ligandi distinti in tre gruppi a seconda della affinità con i vari recettori ErbB.

- ✓ Il primo gruppo si lega specificatamente all'ErbB-1 e comprende il fattore di crescita epidermico (EGF), l'anfiregulina (AR) ed il fattore di crescita trasformante alfa (TGF- α).
- ✓ Il secondo gruppo, capace di legarsi sia ad ErbB-1 che ad ErbB-4, comprende la betacellulina (BTC), il fattore di crescita legante l'eparina (HB-EGF) e l'epiregulina (EPR).
- ✓ Il terzo gruppo comprende le neureguline (NRGs). In particolare NRG1 e NRG2 si legano sia ad ErbB-3 che ad ErbB-4, mentre le NRG3 e NRG4 legano specificamente ErbB-4 (Hynes & Lane, 2005).

Per quanto riguarda ErbB-2 invece non è noto un specifico ligando in grado di attivare il recettore.

5.1.5 Vie molecolari attivate dai recettori ErbB

Il legame del dominio extracellulare del recettore ErbB con i ligandi specifici induce il passaggio dalla forma inattiva alla conformazione aperta, con conseguente omo o

eterodimerizzazione dei recettori. Solo ErbB-2 è in grado di dimerizzare senza la presenza di uno specifico ligando (Hynes & Lane, 2005).

La dimerizzazione dei recettori ErbB determina a sua volta la fosforilazione dei residui di tirosina del dominio intracellulare, permettendo il reclutamento e l'attivazione di messaggeri secondari che avviano la cascata del segnale (Baselga & Swain, 2009).

Il tipo di ligando ed il partner di dimerizzazione determinano, quindi, la tipologia di cascata da attivare.

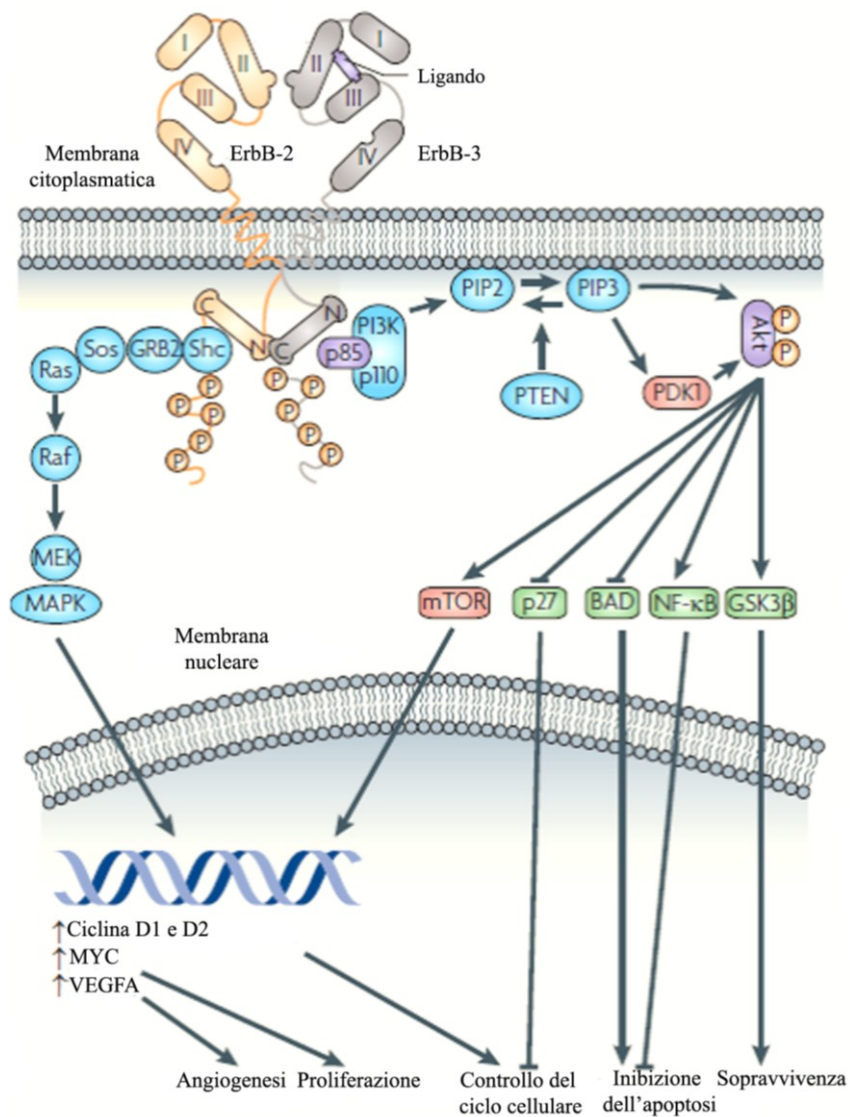
Nello specifico, le due principali vie che vengono attivate da recettori ErbB sono la MAPK e la PI3K-Akt (Figura 5.5) (Hynes & Lane, 2005).

Nella cascata MAPK, la proteina adattatrice GRB2 si lega ai recettori ErbB o indirettamente attraverso Shc o direttamente attraverso i residui di tirosina fosforilati. Il complesso GRB2-Sos recluta Ras e attiva la via MAPK, inducendo l'angiogenesi, la proliferazione cellulare ed intervenendo sui meccanismi di controllo del ciclo cellulare (Baselga & Swain, 2009).

La via PI3K-Akt è attivata da almeno due vie correlate ad ErbB. Nella prima via di attivazione, la subunità regolatoria (p85) del PI3K si lega direttamente a residui fosforilati di tirosina innescando l'attivazione della subunità catalitica p110 di PI3K. Nella seconda via, GRB2 si lega direttamente o indirettamente tramite Shc ad ErbB attivando Ras, che innesca anche l'attivazione di p110 (Cully et al., 2006; Baselga & Swain, 2009). Il PI3K attivato determina la fosforilazione del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP2) in fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato (PIP3), che recluta ed attiva Akt e la chinasi fosfatidilinositolo-dipendente1 (PDK1). Il PTEN defosforila PIP3 in PIP2 e inibisce l'attivazione della via PI3K-Akt (Cully et al., 2006). L'Akt attivato fosforila molte proteine bersaglio associate con la proliferazione e la crescita cellulare. Inoltre,

Akt promuove l'angiogenesi attraverso il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e l'hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) (Vivanco & Sawyers, 2002).

Figura 5.5. Vie molecolari attivate dai recettori ErbB in seguito alla dimerizzazione di ErbB-2 e ErbB-3 (modificato Baselga & Swain, 2009)



5.1.6 Recettore tirosin-chinasico ErbB-2 (HER2) e cancro al seno della donna

Nell'uomo, il gene *v-Erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2* (*ERBB2*) è un oncogene situato sul cromosoma 17q12 che codifica per una glicoproteina trans-membrana di 1255 amminoacidi detta recettore tirosin-chinasico ErbB-2 o più semplicemente recettore HER2 (Universal Protein Resource - UniProt; Wolff et al., 2007).

La scoperta dell'oncogene *ERBB2* può essere fatta risalire al 1981 quando Shih e collaboratori dimostrarono che il DNA estratto da linee cellulari di glioblastoma di ratto e contenente *ERBB2* era capace di trasformare in senso neoplastico la linea cellulare NIH3T (Shih et al., 1981).

In seguito, nel 1984, Schechter dimostrò la presenza dell'oncogene in varie linee cellulari provando, inoltre, che *ERBB2* codificava per una proteina sierologicamente legata, ma differente, dal recettore per il fattore di crescita epidermico EGFR (Schechter et al., 1984).

Nel 1985, lo stesso autore dimostra come l'omologia tra i geni *ERBB2* ed *EGFR* è limitata alla regione del dominio chinasico ed individua la posizione di *ERBB2* nel cromosoma 17 (Schechter et al., 1985). Nello stesso periodo, viene dimostrato che l'oncogene *ERBB2* mostra una significativa somiglianza con il *v-erbB*, un oncogene retrovirale responsabile dell'eritroblastosi aviaria (Downward et al., 1984).

In seguito, numerosi altri gruppi di ricerca hanno isolato e clonato l'oncogene *ERBB2* dimostrando l'esistenza della glicoproteina transmembrana HER2 (Coussens et al., 1985; Akiyama et al., 1986; Yamamoto et al., 1986).

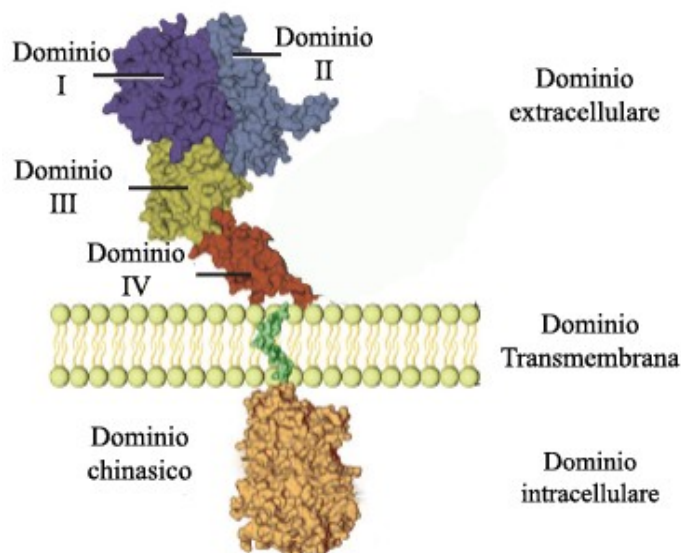
Tuttavia, l'importanza assunta dall'HER2 nel processo carcinogenetico può essere fatta risalire al 1987 quando Slamon dimostra che l'amplificazione del gene *ERBB2* e la

sovraespressione della proteina HER2, nei tumori al seno della donna, sono fattori correlati ad una prognosi sfavorevole (Slamon et al., 1987; Slamon et al., 1989).

La sovraespressione proteica di HER2 nei carcinomi mammari della donna deriva, quindi, dall'amplificazione del gene *ERBB2* accompagnata da un' aumentata sintesi di mRNA (Park et al., 2008). L'aumento dell'espressione della glicoproteina, può, tuttavia, avvenire, in un numero limitato di casi, anche attraverso meccanismi trascrizionali/traslazionali non accompagnati da amplificazione genica (Park et al., 2008).

Come gli altri recettori ErbB, HER2 è una glicoproteina trans-membrana costituita da un dominio extracellulare N-terminale glicosilato, contenente a sua volta quattro subdomini (I, II, III e IV) con un potenziale sito per il ligando tra i domini I e III, una singola elica trans-membrana ed un dominio intracellulare ad attività chinasi (Figura 5.6) (Park et al., 2008)

Figura 5.6. *Struttura schematica del monomero HER2 (modificato da Park et al., 2008)*



La struttura del recettore HER2, tuttavia, appare differente dagli altri componenti della famiglia ErbB, poiché, non presentando specifiche interazioni molecolari tra i subdomini II e IV della componente extracellulare, mantiene una conformazione aperta con

una costante esposizione del sito di dimerizzazione (Figura 5.6). Questa caratteristica fa sì che il recettore HER2 sia il partner di eterodimerizzazione preferito per gli altri membri ErbB (Hynes & Lane, 2005; Park et al., 2008; Baselga & Swain, 2009).

Come precedentemente accennato, a seguito della formazione di omo od eterodimeri si assiste, fisiologicamente, all'inizio di una cascata molecolare in grado di regolare la migrazione, l'adesione, la crescita e la proliferazione cellulare (Figura 5.5).

Durante il processo carcinogenetico, l'amplificazione genica rende disponibili numerose glicoproteine HER2 (10^5 - 10^6 recettori per cellula), facilitando quindi il processo di dimerizzazione con gli altri recettori (Park et al., 2008).

La sovraespressione dell'HER2, deregolando e, sostanzialmente, potenziando le vie PI3K e MAPK determina un aumento della proliferazione cellulare, un'inibizione dei meccanismi di apoptosi ed un aumento delle capacità di metastatizzazione delle cellule neoplastiche.

La persistente attivazione del fattore nucleare (NF)- κ B all'interno della via PI3K promuove la proliferazione cellulare e previene l'apoptosi cellulare, mentre la continua deregolazione della via MAPK consente alle cellule neoplastiche di aumentare le caratteristiche di invasività e di metastatizzazione (Figura 5.5) (Zhou & Hung, 2003; Park et al., 2008).

L'amplificazione del gene *ERBB2*, associata alla sovraespressione del suo prodotto proteico, si osserva in circa il 10%–34% dei carcinomi al seno della donna e risulta essere, anche in analisi univariate, un parametro prognostico negativo dimostrando un associazione con tempi di sopravvivenza ridotti, elevato tasso di recidiva e capacità metastatica della neoplasia (Ross et al., 2009). L'amplificazione di questo gene, inoltre, è messa in relazione con parametri clinico-patologici indicativi di un comportamento

biologico aggressivo come l'elevato grado istologico e la perdita dell'espressione recettoriale dell'ER e del PR (Ross et al., 2009).

A partire dagli anni 90', in virtù del ruolo assunto dall'HER2 da un punto di vista prognostico nel carcinoma alla mammella della donna, si è assistito allo sviluppo di molecole ad attività farmacologica di tipo terapeutico indirizzati selettivamente contro questa glicoproteina (Hudis, 2007; Ross et al., 2009; Tebbutt et al., 2013).

Utilizzando tecniche ricombinanti, la Genentech Corporation ha sviluppato un anticorpo monoclonale murino con potenzialità terapeutiche (*Trastuzumab* - Herceptin™; Genentech, South San Francisco, CA) che, legandosi alla porzione extracellulare del recettore HER2, è in grado di inibire la cascata di segnali attivati dalla glicoproteina e, conseguentemente, di aumentare i tempi di sopravvivenza dei pazienti affetti da carcinoma mammario.

Il legame del *Trastuzumab* con il recettore impedisce la dimerizzazione, favorisce l'internalizzazione e la degradazione della glicoproteina e scatena una risposta immunitaria cellulo-mediata contro il recettore stesso (Hudis, 2007).

La Food and Drug Administration (FDA) ha approvato l'utilizzo clinico di questo farmaco in pazienti affetti da carcinoma mammario positivo all'HER2 a seguito di trials clinici che hanno evidenziato come la sua somministrazione riduca il rischio di recidive e aumenti sensibilmente il tempo di sopravvivenza (Hudis, 2007).

Il trattamento farmacologico di pazienti affetti da cancro al seno con terapie anti-HER2 è considerato specifico in caso di tumori che mostrano l'amplificazione del gene *ERBB2* e/o la sovraespressione della proteina HER2. In particolare, in accordo con le linee guida dell'*American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists*, le due metodiche standards per testare, nei tumori alla mammella della donna, lo stato del gene *ERBB2* e della proteina HER2 sono rispettivamente l'ibridazione in situ

fluorescente (FISH) e l'immunoistochimica (IHC) (Wolff et al., 2007). Queste tecniche mostrano alti livelli di correlazione tra espressione genica e proteica (Wolff et al., 2007).

Nel 1998, il sistema noto come HercepTest™ (Dako), che utilizza l'anticorpo policlonale prodotto in coniglio diretto contro la proteina umana *c-erbB-2* (Clone A485, Dako), viene approvato dalla FDA come strumento diagnostico in grado di fornire una valutazione dell'espressione della proteina HER2 nel cancro al seno della donna.

Da allora sono stati approvati dalla FDA altri quattro sistemi diagnostici simili all'HercepTest™: anti-HER2/neu (clone CB11, Ventana; 2000), InSite HER2/neu kit (clone CB11, Biogenex; 2004), Pathway Anti-HER2/neu (clone 4B5; Ventana; 2007) e Bond Oracle HER2 (clone CB11, Leica; 2012).

La dimostrazione della presenza o della sovraespressione della proteina HER2, mediante questi kit commerciali, viene ottenuta incubando la sezione di tessuto mammario con un anticorpo primario in grado di legarsi specificatamente agli antigeni di HER2. Tale legame viene, poi, visualizzato mediante reazioni enzimatiche che permettono la precipitazione di un colorante, detto cromogeno, sul sito di legame tra l'anticorpo e l'antigene tissutale, rendendolo visibile al microscopio ottico.

La localizzazione del segnale di membrana in associazione all'intensità della colorazione consente una valutazione semiquantitativa del livello di espressione proteica. I risultati della valutazione di tale espressione, distinti in quattro gradi (0, 1+, 2+ e 3+), sono generalmente correlati al riscontro di amplificazione del gene *ERBB2*. In particolare, il punteggio 3+ è indicativo di un'amplificazione del gene, il 2+ è considerato dubbio e gli score 0 ed 1+ negativi (Wolff et al., 2007; Ross et al., 2009). Nei casi dubbi si ricorre all'ibridazione in situ fluorescente (FISH), metodica che permette di rilevare, localizzare e quantificare specifiche sequenze di DNA nei

cromosomi, fornendo, quindi, un'indicazione sull'amplificazione del gene *ERBB2* (Wolff et al., 2007).

5.1.7 Recettore tirosin-chinasico ErbB-2 (HER2) e neoplasie mammarie del cane

In medicina veterinaria, ed in particolare, nei tumori mammari del cane (CMT), sono stati condotti numerosi studi volti a chiarire il ruolo del recettore HER2 nel processo carcinogenetico mammario.

Nel cane, il gene *ERBB2* è stato mappato da Murua Escobar (2001), con esperimenti di FISH, nel cromosoma 1q13.1, anche se attualmente, in accordo con il Andelfinger (2004) tale gene viene localizzato nel cromosoma 9.

Il gene *ERBB2* codifica per una proteina di 1259 aminoacidi, con peso molecolare di circa 138 kDa, che mostra un'omologia aminoacidica del 92% con la proteina HER2 umana (Universal Protein Resource - UniProt; Singer et al., 2012).

Numerose ricerche hanno dimostrato l'esistenza di amplificazione genica e/o di sovraespressione della proteina nei CMT (Ahern et al., 1996; Rungsipipat et al., 1999; Matsuyama et al., 2001; De Las Mulas et al., 2003; Dutra et al., 2004; Hsu et al., 2009, Kim et al., 2011; Muhammadnejad et al., 2012; Ressel et al., 2013).

La prima segnalazione della presenza del gene *ERBB2* nei CMT risale al 1996, quando Ahern (1996) ha dimostrato un aumento dei livelli di mRNA dell'oncogene nel 74% dei carcinomi mammari non associato al grado di invasività delle neoplasie o alla presenza di metastasi viscerali.

Successivamente, la sovraespressione della proteina HER2 è stata riportata nella mammella sana (38%) (Ressel et al., 2013), nelle lesioni iperplastiche mammarie con una percentuale variabile dallo 0 al 27% dei casi (Ferreira et al., 2010; Ressel et al., 2013), nei tumori benigni (dallo 0 al 40.6%) (Rungsipipat et al., 1999; Dutra et al.,

2004; Hsu et al., 2009) e nei tumori maligni (dal 17.6% al 35.4%) (De Las Mulas et al., 2003; Muhammadnejad et al., 2012).

L'estrema variabilità nell'espressione fenotipica dell'oncoproteina è stata frequentemente attribuita, da questi autori, alla scarsa standardizzazione delle metodiche immunoistochimiche utilizzate e/o alla presenza di fattori preanalitici come la differente durata dei tempi di fissazione dei campioni in formalina.

Interessante, inoltre, riportare che nei CMT la sovraespressione dell'HER2 non sembra conseguire all'amplificazione genica dell'oncogene. Infatti, in un esperimento condotto da De Las Mulas (2003), dove sono stati valutati simultaneamente i livelli genici e proteici dell'HER2, l'amplificazione del gene non è stata riscontrata nei tumori che mostravano sovraespressione della proteina.

Numerosi lavori hanno associato la sovraespressione dell'oncoproteina ad un comportamento biologico aggressivo dei CMT (Dutra et al., 2004; Muhammadnejad et al., 2012), così come ad una riduzione dei tempi di sopravvivenza dell'animale (De Las Mulas et al., 2003). Tuttavia, in questo caso, la letteratura veterinaria fornisce dati estremamente contrastanti tra loro, infatti Hsu (2009), Kim (2011) e Ressel (2013) hanno dimostrato la mancanza di una associazione tra l'espressione dell'HER2 e i parametri clinico-patologici, riportando, inoltre, un aumento dei tempi di sopravvivenza in cani affetti da CMT HER2 positivi (Hsu et al., 2009).

Dalla letteratura veterinaria emergono, quindi, delle sostanziali incongruenze sulla correlazione dell'espressione del recettore HER2 con i vari parametri indicativi di un comportamento biologico aggressivo delle neoplasie mammarie, e di conseguenza, con il potenziale valore prognostico attribuito a questa oncoproteina da alcuni autori.

Pertanto, al fine, di delucidare maggiormente il ruolo dell'HER2 nei CMT la nostra ricerca è stata indirizzata ad una attenta valutazione dell'espressione genica e proteica di

ERBB2/HER2 mediante l'utilizzazione di tecnologie molecolari convenzionali (IHC, WB, RPPA) ed innovative (qRT-PCR e Spettrometria di Massa ad alta risoluzione).

5.2 Materiali e Metodi

Raccolta dei campioni

In questo studio sono stati presi in considerazione 23 campioni di tessuto mammario sano e neoplastico, pervenuti negli anni dal 2009 al 2012 al Laboratorio di Diagnostica Patologica Veterinaria del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Sassari.

Il materiale conservato “fresco”, ottenuto in seguito a mastectomia, derivava da 16 cagne sterilizzate in età adulta (12) ed intere (4), di età compresa tra i 6 ed i 18 anni e appartenenti alle seguenti razze: meticcias (9), Yorkshire Terrier (3), Pinscher (2), Pastore tedesco (1), Doberman (1).

Immediatamente dopo l'asportazione chirurgica, i campioni sono stati divisi in due aliquote speculari e sottoposti a differenti metodiche di conservazione. In particolare, porzioni di tessuto mammario sono state fissate in formalina tamponata al 10% (formaldeide al 4%) per 48 ore quando destinate a processazione istologica ed immunoistochimica, e congelate a -80°C se indirizzate all'estrazione di RNA o alle analisi proteomiche.

Processazione istologica dei campioni e classificazione delle lesioni

I 23 campioni fissati in formalina sono stati disidratati a concentrazioni crescenti di alcoli, inclusi in paraffina, e sezionati, mediante l'utilizzo del microtomo, a 3µm di spessore. Le sezioni sono state successivamente colorate con ematossilina e eosina (E&E). La valutazione istopatologica dei tumori mammari è stata effettuata al microscopio ottico (Nikon Eclipse 80i) seguendo le linee guida della classificazione dei tumori mammari del cane e del gatto proposta dalla WHO (Misdorp et al., 1999). Le

lesioni iperplastiche, quali l'iperplasia tipica (UH) ed atipica (ADH), ed il carcinoma duttale *in situ* (DCIS) sono state classificate secondo la WHO *Classification of Tumors of the Breast* (Ellis et al., 2003) utilizzata in medicina umana e applicata precedentemente nel cane da Antuofermo (2007) e Mouser (2010).

Analisi immunoistochimica del recettore ErbB-2 (HER2)

Dagli stessi campioni processati per l'istopatologia, sono state ottenute sezioni seriali di 4 µm di spessore, montate su vetrini portaoggetti caricati positivamente (Superfrost, Fisher Scientific). Le sezioni sono state sottoposte ad indagine immunoistochimica, utilizzando la tecnica avidina biotina perossidasi (ABC), utilizzando un kit commerciale (Invitrogen, Milano, Italia).

Nel dettaglio, le sezioni sono state sparaffinate e reidratate attraverso una serie decrescente di alcoli. Gli antigeni sono stati smascherati con riscaldamento ad alta temperatura per 40 minuti a 90-95°C in una soluzione 10 mM di tampone citrato a pH 6, tramite l'utilizzo di uno steamer. Le sezioni sono state tenute a temperatura ambiente per 20 minuti e sottoposte a blocco delle perossidasi endogene per 30 min in una soluzione acquosa di perossido di idrogeno al 3%. I legami aspecifici sono stati bloccati attraverso l'incubazione con siero di capra al 10% (Invitrogen, Milano, Italia). Le sezioni sono state, quindi, incubate *over night* a 4°C in camera umida con un anticorpo prodotto in coniglio diretto contro la proteina umana *c-erbB-2* (Clone A485, Dako, Milano, Italia) diluito 1:100 in PBS (0.01 M; pH 7.4) e, successivamente, con un anticorpo secondario biotinitato (Invitrogen, Milano, Italia).

La reazione colorimetrica è stata evidenziata tramite l'utilizzo del cromogeno 3,3 diaminobenzidina (Dako, Milano, Italia). I tessuti sono stati, quindi, controcolorati con

l'ematossilina di Mayer, sottoposti a disidratazione in soluzioni crescenti di alcoli, ed infine montati in EUKITT (Fisher Scientific).

I controlli negativi sono stati ottenuti sostituendo l'anticorpo primario con siero di coniglio, mentre come controllo positivo sono state utilizzate le sezioni della DAKO K5204, contenenti tre linee cellulari di carcinoma mammario (MDA-231, MDA-175, SKBR-3) a livelli di espressione differente della proteina HER2

Valutazione immunoistochimica

Il livello di espressione della glicoproteina HER2 nei i tessuti mammari canini è stato valutato al microscopio ottico (Nikon Eclipse 80i) utilizzando il sistema HercepTest™ (Dako), impiegato routinariamente in medicina umana nei tumori al seno, ed in maniera del tutto sovrapponibile a quanto precedentemente in medicina veterinaria (De Las Mulas et al., 2003; Dutra et al., 2004; Antuofermo et al., 2007; Hsu et al., 2009; Mouser et al., 2010; Kim et al., 2011; Muhammadnejad et al., 2012; Ressel et al., 2013).

In particolare, il sistema HercepTest™, riportato in tabella 5.1, è basato sulla valutazione del numero delle cellule neoplastiche che esprimono l'antigene e sull'intensità e sulla localizzazione di membrana del segnale ed attribuisce quattro gradi di punteggio (0, 1+, 2+ e 3+), indicativi della assenza (0, 1+) o della sovraespressione (3+) della oncoproteina HER2. Il punteggio 2+ viene considerato dubbio (HercepTest™, Wolff et al., 2007; Ross et al., 2009).

Tabella 5.1. *HercepTest™. Sistema di attribuzione del punteggio relativo all'espressione di HER2.*

Valutazione del numero, dell'intensità e della localizzazione della colorazione di membrana nelle cellule tumorali	Punteggio
Non si osserva nessuna colorazione oppure la membrana si colora in meno del 10% delle cellule tumorali	0
Si osserva una debole e parziale colorazione di membrana in più del 10% delle cellule tumorali	1+
Si osserva una debole o moderata, completa colorazione di membrana in più del 10% delle cellule	2+
Si osserva una completa ed intensa colorazione di membrana in più del 10% delle cellule	3+

Espressione del gene *ERBB2*

I 23 campioni di tessuto mammario sono stati, inoltre, sottoposti a quantificazione relativa dell'espressione del gene *ERBB2* attraverso quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR).

Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto dai tessuti precedentemente congelati a -80°C utilizzando il kit commerciale SV Total RNA Isolation System (Promega, Milano, Italia). Circa 30 mg di tessuto sono stati omogeneizzati in 1 ml di buffer di lisi (SV RNA Lysis Buffer) al fine di ottenere una sospensione uniforme. Alla sospensione (175 µl) sono stati aggiunti 350 µl di buffer di diluizione (SV Dilution Buffer), e la sospensione è stata incubata in un bagnetto termostato a 70°C per 3 min. Il lisato contenente l'RNA è stato centrifugato al fine di allontanare le proteine precipitate ed i detriti cellulari, e l'RNA è stato precipitato con etanolo e passato su colonna (Spin Column). La digestione del DNA genomico contaminante è stata effettuata con RNase-Free DNase I.

L'RNA totale legato alla membrana della colonna è stato ulteriormente purificato dalle proteine e dalle impurità cellulari mediante lavaggi con soluzioni in uso al kit. Infine, l'RNA totale è stato eluito dalla membrana aggiungendo 100µl di acqua Nuclease-Free. L'integrità dell'RNA totale è stata controllata tramite elettroforesi in gel di agarosio al 2%, mentre la concentrazione di RNA e la sua purezza sono state determinate misurando l'assorbanza spettrofotometrica a 260 nm e il rapporto di assorbanza 260/280 nm.

Reazione di trascrittasi inversa

L'RNA totale è stato retro-trascritto in cDNA utilizzando un kit commerciale (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystem, Foster City, CA); brevemente, 3µg di RNA totale sono stati aggiunti alla RT Master Mix 2X (RT buffer 1X, 8mM di ogni dNTPs, RT Random Primers 1X, 50 U di MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 40 U di RNase Inhibitor). I 50 µl della reazione sono stati incubati in un termociclatore (Applied Biosystems 9700) per 10 min a 25°C, 120 min a 37°C, 5 min a 85°C e poi tenuti a 4°C.

Scelta dei primers e quantificazione relativa

I primers per *ERBB2* specifici per il cane sono stati disegnati utilizzando il sito web Assays-on-Demand™ Products (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Tabella 5.2).

Le reazioni di qRT-PCR sono state effettuate utilizzando la TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) contenente 300 nM di ciascun primer, 200 nM di sonde e 54ng di cDNA, in relazione alla concentrazione iniziale di RNA, in un volume totale di 50µl ed utilizzando lo strumento ABI 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Per ogni reazione, condotta in

uplicato, il protocollo consisteva in uno step a 95°C per 10 minuti, seguito da 40 cicli di amplificazione a 95°C per 15 secondi ed 1 minuto a 60°C.

La quantificazione relativa dell'espressione genica è stata calcolata utilizzando il metodo comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ come descritto da Livak & Schmittgen (2001). I dati sono rappresentati come valore relativo di espressione genica (*Fold change –FC*) di *ERRB2* nel campione di interesse, normalizzati alla media geometrica dei geni di riferimento *MSRP5* e *HRTF* (Mitochondrial Ribosomal Protein S5 e Hypoxanthine phosphoribosyltransferase) e relativi alla mammella sana (Etschmann et al., 2006).

A questo proposito, è noto come l'utilizzo di più geni di riferimento endogeni migliori l'attendibilità dei risultati riducendo l'influenza delle variazioni d'espressione di un singolo housekeeping (Tricarico et al., 2002; Vandesompele et al., 2002; Fischer et al., 2005). Per questo, dopo aver testato una serie di geni di riferimento, è stato scelto di utilizzare, come fattore di normalizzazione la media geometrica dell'espressione di *MSRP5* e dell'espressione di *HRTF* (Etschmann et al., 2006). Inizialmente, i ΔCt del campione di interesse ed i ΔCt della mammella sana sono stati calcolati sottraendo al valore Ct medio del gene target la media geometrica dei Ct dei geni di riferimento dello stesso campione. Il $\Delta\Delta CT$ è stato calcolato sottraendo al valore del ΔCt del campione di interesse il ΔCT della mammella sana. Infine, è stato calcolato il valore relativo FC di espressione genica del gene target ($FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) rispetto alla mammella sana.

Tabella 5.2. Primers utilizzati per la qRT-PCR

<i>ERRB2</i>	Assays-on-Demand Gene Expression Products (Cf02621855_g1, Applied Biosystems)
<i>MRPS5</i>	Assays-on-Demand Gene Expression Products (Cf02626256_m1, Applied Biosystems)
<i>HPRT1</i>	Assays-on-Demand Gene Expression Products (Cf02639972_m1, Applied Biosystems)

Analisi proteomiche

Al fine di indagare ulteriormente l'espressione dell'oncoproteina HER2, 8 tessuti mammari sono stati sottoposti a SDS-PAGE, Western Immunoblotting (WB), Reverse phase protein array (RPPA) e 2 campioni ad analisi in spettrometria di massa tandem (GeLC-MS/MS) dal gruppo dei "ricercatori di proteomica" di Porto Conte Ricerche. La linea cellulare umana SKBR-3, sovraesprime HER2, è stata utilizzata come controllo positivo (ICLC HTL03005, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italia).

Estrazione delle proteine ed elettroforesi

Le proteine sono state estratte incubando per 15 min a 95°C i tessuti mammari e la linea cellulare SKBR-3 in 100 microlitri di tampone di estrazione (2% sodio dodecil solfato (SDS), 0.1 M ditiotreitolo e 20 mM Tris-HCl pH 8,8), addizionato con inibitori delle proteasi (SIGMAFAST™ Protease Inhibitors; Sigma, St. Louis, MO, USA). I campioni sono stati omogeneizzati per 5 min a 30 Hz utilizzando un TissueLyser LT (Qiagen) e, dopo centrifugazione, il contenuto proteico è stato quantificato utilizzando un kit commerciale (EZQ fluorescent kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Due microgrammi di proteine sono stati separati elettroforeticamente in un gel di poliacrilamide all'8% (SDS-PAGE) per le successive analisi di Western Immunoblotting, mentre 30 microgrammi degli estratti proteici ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica SDS-PAGE in un gel di poliacrilamide al 12%, colorato con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) da utilizzare per la successiva analisi in spettrometria di massa.

Western Immunoblotting (WB) e Reverse phase protein array (RPPA)

Gli estratti proteici separati tramite SDS-PAGE sono stati trasferiti su membrane di nitrocellulosa (HybondTM-C, GE Healthcare) per l'analisi WB. Le membrane sono state bloccate con tampone fosfato (PBS, Sigma-Aldrich), contenente 0.05% di Tween e il 3% di albumina sierica bovina (BSA).

Gli stessi estratti proteici sono stati trasferiti su un'altra membrana di nitrocellulosa e diluiti in cinque diluizioni seriali (1:2, 1:04, 1:08, 1:16, 1:32) in tampone fosfato (PBS, Sigma-Aldrich) per l'analisi RPPA. Entrambi le membrane sono state incubate con un anticorpo prodotto in coniglio diretto contro la proteina umana *c-erbB-2* (Clone A485, Dako, Milano, Italia) alla diluizione 1:1000. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, le membrane sono state lavate ed incubate con un anticorpo secondario prodotto in capra e diretto contro le immunoglobuline di coniglio (Sigma-Aldrich) alla diluizione 1:250.000. L'immunoreattività è stata rilevata utilizzando un substrato perossidasiico chemiluminescente (Sigma-Aldrich) e visualizzata con il sistema di imaging VersaDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Spettrometria di Massa ad alta risoluzione

Le regioni del gel comprese tra i 100 e 250 kDa e tra i 50 e 60 kDa ottenute dalla SDS-PAGE, sono state tagliate, decolorate, ridotte, carbamidometilate, digerite in tripsina e sottoposte ad analisi in spettrometria di massa utilizzando uno spettrometro ad alta risoluzione (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), utilizzato in modalità HCD (High-energy Collision-induced Dissociation), interfacciato con un sistema di cromatografia liquida UPLC (UltiMate 3000 RSLCnano LC system, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). In particolare, la prima regione del gel compresa tra i 100-250 kDa dovrebbe contenere la proteina HER2, che, nella variante di splicing principale, sia

nel cane che nella donna, è riportata ad un PM di 138 kDa, mentre il secondo intervallo di PM è stato selezionato per investigare la possibile presenza di frammenti di degradazione di HER2 o di ulteriori varianti di splicing (Universal Protein Resource – UniProt). L'identificazione delle proteine e dei peptidi è stata effettuata utilizzando la piattaforma bioinformatica Proteome Discoverer (versione 1.4; Thermo Scientific).

Analisi Statistica

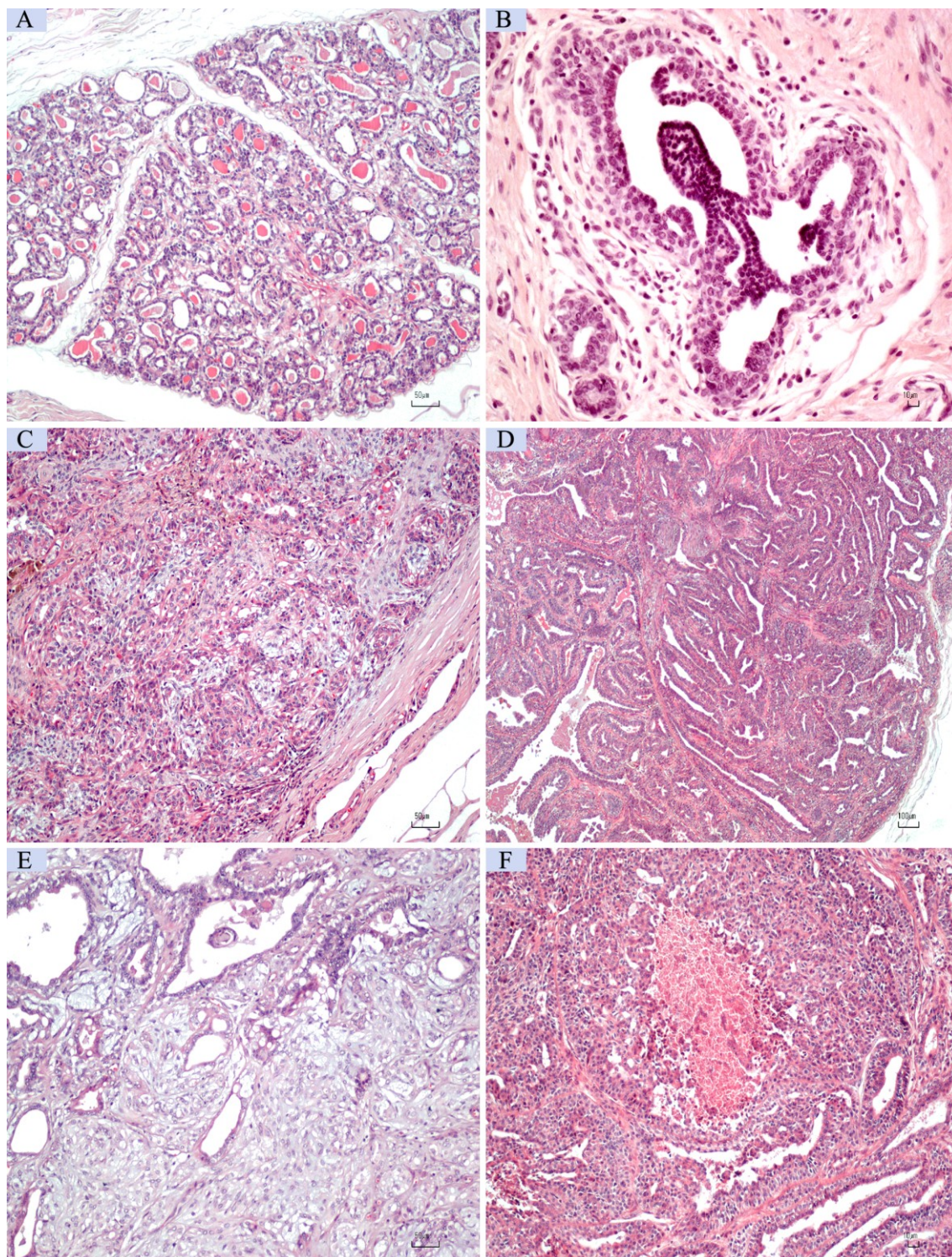
Le analisi statistiche relative ai risultati di immunohistochimica e a quelli di espressione genica sono state effettuate mediante l'utilizzo del programma Stata 11.2 (StataCorp LP) con test non parametrici quali test della correlazione di Spearman e test di Kruskal-Wallis. L'analisi post-hoc del test di Kruskal-Wallis è stata effettuata con il test di Mann-Whitney. Il limite di significatività dei test è stato fissato per $P < 0.05$.

4.3 Risultati

Classificazione istologica delle lesioni

L'analisi istopatologica dei campioni ha permesso di evidenziare 20 lesioni rappresentate da 3 lesioni iperplastiche/displastiche (UH-ADH), 1 carcinoma duttale *in situ* (DCIS), 7 neoplasie benigne e 9 maligne (Figura 5.7). In particolare, le neoplasie, in base all'istotipo neoplastico coinvolto, sono state classificate in adenomi semplici (4) e in adenomi complessi (3), in carcinomi semplici (5) e in carcinomi complessi (4). Tutti i carcinomi semplici erano di tipo tubulopapillare e moderatamente differenziati (grado II). Sono stati classificati, inoltre, 3 campioni di tessuto ghiandolare sano da utilizzare come controllo nei vari esperimenti. Inoltre, è stata riscontrata la presenza di lesioni mammarie multiple in 6 cani (3 Yorkshire Terrier; 2 Pinscher; 1 meticcio).

Figura 5.7. *Aspetto istologico di una ghiandola mammaria (A), di una lesione iperplastica (B), di un adenoma complesso (C), di un adenoma semplice (D), di un carcinoma complesso (E) e di un carcinoma semplice (F). Ematossilina Eosina, bar 10 μ m (B), 50 μ m (A-C-E), 100 μ m (D)*

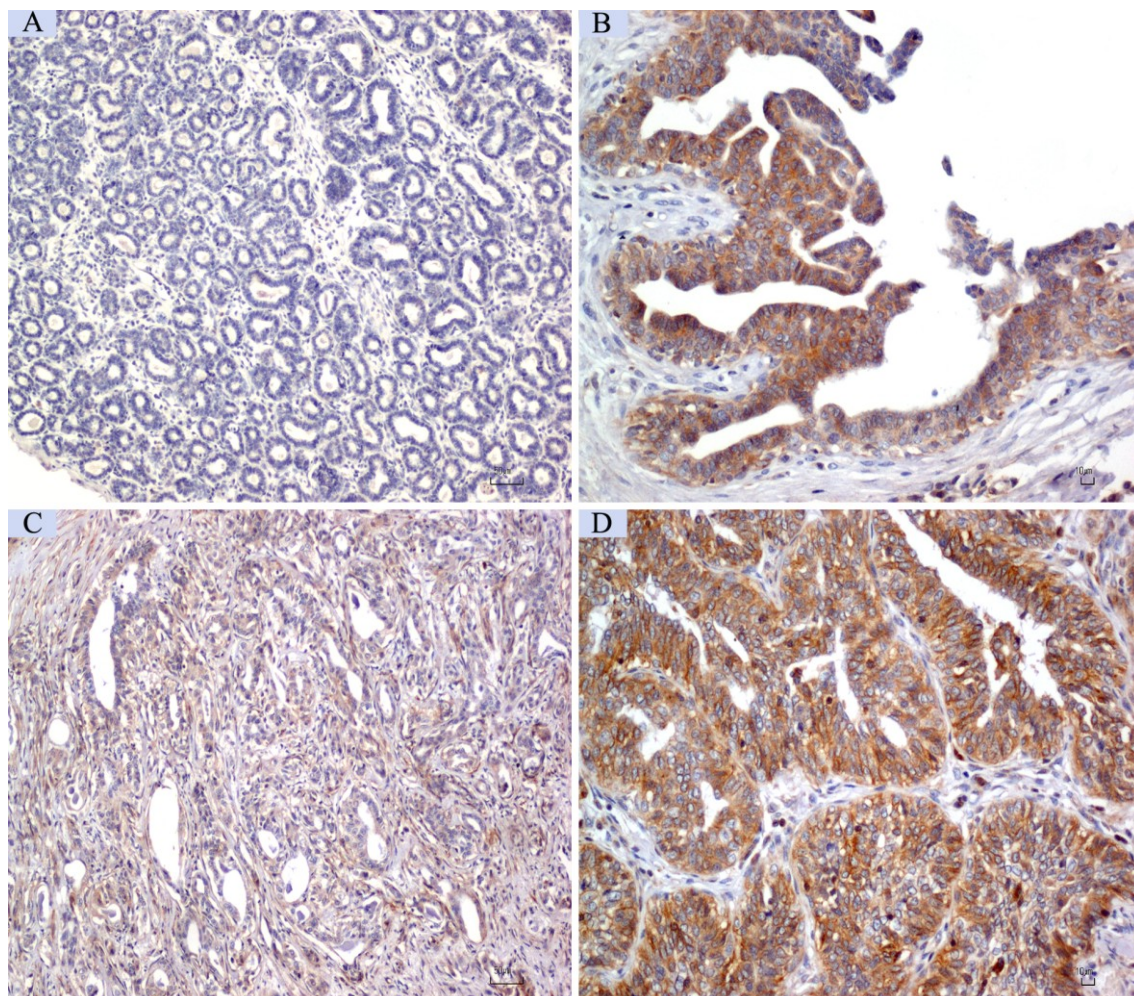


Valutazione immunoistochimica del recettore ErbB-2 (HER2)

La valutazione dell'espressione dell'oncoproteina HER2, come precedentemente accennato nella sezione dei Materiali e Metodi, è stata effettuata in accordo con le linee guida codificate dal sistema HercepTest™ (Dako), considerando come positivo solo il segnale riscontrato a livello della membrana plasmatica. Tuttavia, in tutte le lesioni esaminate, sia nelle cellule epiteliali che mioepiteliali, è stata osservata la presenza di una inattesa immunopositività citoplasmatica (Figura 5.8).

Due carcinomi invasivi (1 carcinoma semplice ed 1 complesso) (22%) hanno mostrato un'intensa e completa immunoreattività di membrana in più del 10% delle cellule epiteliali (punteggio 3+). Due lesioni iperplastiche (66%), il carcinoma *in situ* (100%) e due carcinomi semplici (22%) hanno mostrato una moderata e completa colorazione di membrana in più del 10% delle cellule (punteggio 2+). Una lesione iperplastica (33%) ed 1 adenoma complesso (14%) hanno mostrato una parziale colorazione di membrana nel 10% delle cellule epiteliali (punteggio 1+). Le altre lesioni e le ghiandole mammarie sane non hanno evidenziato l'espressione dell'antigene di membrana HER2. Le differenze osservate tra le varie neoplasie ed il tessuto sano non sono risultate statisticamente significative ($P>0.05$).

Figura 5.8. Espressione immunoistochimica dell'HER2 in una ghiandola mammaria sana (A) (punteggio IHC=0), in una lesione iperplastica (B) (punteggio IHC=+2), in un adenoma complesso (C) (punteggio IHC=+1) ed in un carcinoma semplice (D) (punteggio IHC=+3). Contrasto Ematossilina di Mayer, bar 10 μ m (B-D), 50 μ m (A-C).



Valutazione dell'espressione del gene *ERBB2*

L'espressione del gene *ERBB2* è risultata variabile nelle varie classi dei campioni considerati (Tabella 5.3). In particolare, il tessuto ghiandolare sano ha mostrato una espressione dei livelli di mRNA statisticamente inferiore rispetto agli adenomi ed ai carcinomi semplici ($p < 0.01$). Inoltre, sebbene non statisticamente significativo, si è osservato un aumento crescente dell'espressione di *ERBB* nelle lesioni iperplastiche, negli adenomi semplici e nei carcinomi semplici ($p > 0.05$)

Tabella 5.3. Valore relativo di espressione genica dell'*ERBB2* nella mammella sana, nelle lesioni iperplastiche/displastiche (UH-ADH) nel carcinoma duttale in situ (DCIS) e nei tumori benigni e maligni

	Mammella sana	UH-ADH	DCIS	Adenoma semplice	Adenoma complesso	Carcinoma semplice	Carcinoma complesso
<i>ERBB2</i>	1±0.13 ^a	2.17±0.05	4.49±0.09	3.72±0.08 ^b	2.37±0.58	4.93±0.39 ^b	2.16±0.07

I dati sono espressi come media ± deviazione standard. ^{a,b} Medie con differenti apici sono statisticamente differenti ($P < 0.05$)

Western Immunoblotting (WB) e Reverse phase protein array (RPPA)

L'inattesa positività citoplasmatica riscontrata con metodica immunohistochimica in tutte le lesioni mammarie esaminate ha indotto un ulteriormente approfondimento della ricerca in merito all'espressione dell'oncoproteina HER2 nei tessuti mammari del cane.

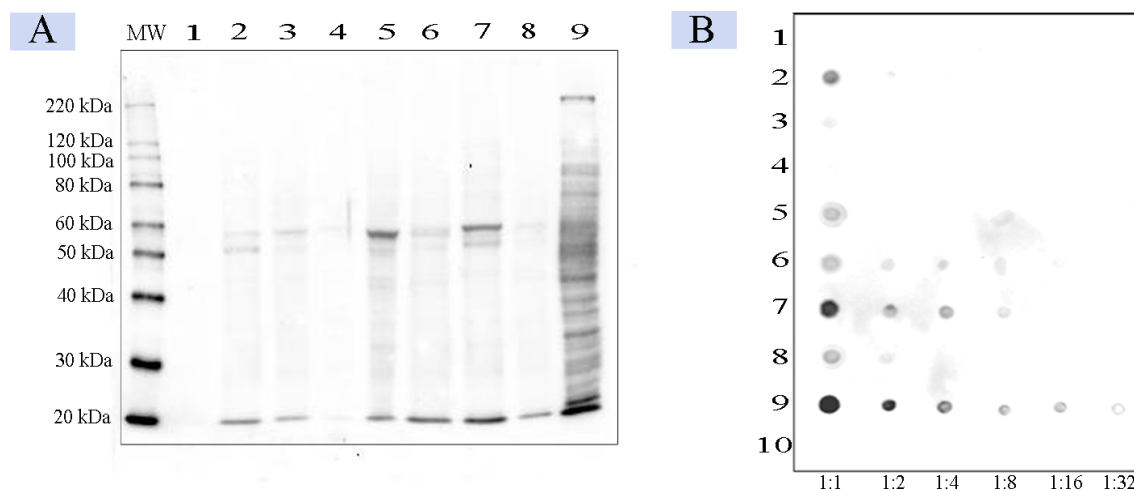
In particolare, 8 campioni rappresentati da 3 ghiandole mammarie sane (punteggio IHC 0), 2 UH/ADH (punteggio IHC 1+ e 2+) e 3 carcinomi semplici (punteggio IHC 0, 2+, 3+) sono stati sottoposti ad analisi WB e RPPA. Come controllo positivo sono state utilizzate le proteine estratte dalla linea SKBR-3 sovraesprimenti HER-2.

Come illustrato nella Figura 5.9-A, non è stato osservato, in tutti i tessuti mammari del cane (lanes 1-8), alcun segnale al peso molecolare di 138 kDa corrispondente all'antigene HER2, mentre sono state osservate due bande non specifiche ad un peso molecolare più basso (tra 50 e 60 kDa) in quasi tutti i campioni analizzati, con una maggiore intensità rilevata a carico di una lesione iperplastica con punteggio IHC 2+ (lane 5) e di un carcinoma semplice con punteggio IHC 3+ (lane 7). Il controllo positivo ha invece mostrato una banda all'altezza del peso molecolare atteso (lane 9).

La reazione antigene anticorpo è stata ulteriormente analizzata con metodica RPPA, al fine di confutare possibili dubbi specificamente correlati con la tecnica WB. Sono state effettuate 5 diluizioni seriali di ogni estratto proteico, con lo scopo di ottenere dei dati semiquantitativi. Come si osserva in Figura 5.9-B, il lisato delle cellule di controllo SKBR-3 mostrava un segnale visibile sino alla diluizione 1:32 (lane 9), mentre un carcinoma semplice mostrava un segnale fino alla diluizione 1:8 (lane 7).

Figura 5.9. *Western immunoblotting (A) nelle ghiandole mammarie sane (lanes 1-3), nelle lesioni iperplastiche/displastiche (lanes 4-5), nei carcinomi semplici (lanes 6-8); nel controllo positivo (lane 9); MW: peso molecolare (MagicMark™ XP Western Protein Standard, Invitrogen).*

Reverse-Phase Protein Array (B) nelle ghiandole mammarie sane (lanes 1-3), nelle lesioni iperplastiche/displastiche (lanes 4-5), nei carcinomi semplici (lanes 6-8), nelle cellule SKBR-3 (lane 9) con 5 diluizioni seriali di ogni estratto proteico. Lane 10 controllo negativo (latte di pecora)

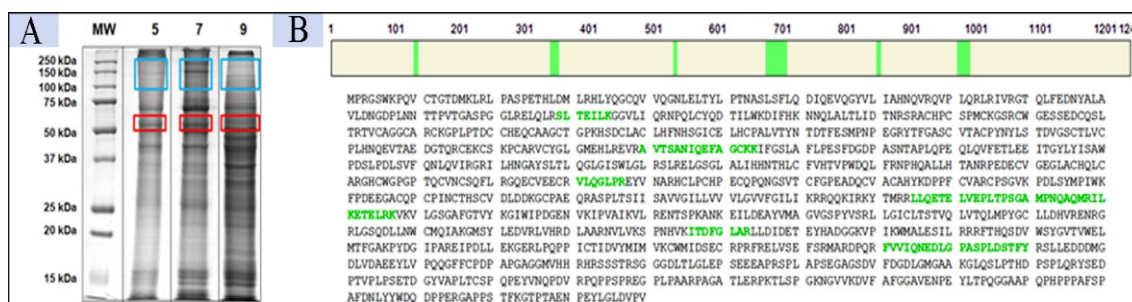


Analisi in spettrometria di massa ad alta risoluzione

Nel WB la mancanza di bande di 138 kDa in tutti i campioni esaminati ha sostanzialmente avvalorato i risultati dell'IHC mostranti un segnale citoplasmatico della proteina di evidente aspecificità. Al fine di indagare ulteriormente lo stato di HER2, è stata valutata l'espressione dell'oncoproteina con una metodica ortogonale (GeLC-MS/MS) in una lesione iperplastica/displastica (punteggio IHC 2+), in un carcinoma semplice (punteggio IHC 3+) e nella linea cellulare SKBR-3 utilizzata come controllo. Tali campioni sono stati selezionati perché mostranti al WB e all'analisi RPPA un segnale maggiormente evidente (Figura 5.9, lanes 5 e 7).

I tre estratti proteici sono stati separati mediante SDS-PAGE e quindi due regioni del gel, tra i 100 e 250 kDa e tra i 50 e 60 kDa, sono state tagliate, digerite, e sottoposte a LC-MS/MS (Figura 5.10-A). L'analisi GeLC-MS/MS ha consentito di identificare la presenza di HER2 nella linea cellulare SKBR-3 nell'intervallo di peso molecolare atteso (8 sequenze peptidiche, confidenza > 99%; Figura 5.10-B) come riportato da Zhang (2013), mentre i campioni selezionati non hanno mostrato la presenza di peptidi appartenenti alla proteina HER2 ed in generale alla famiglia dei recettori ErbB nei due intervalli di peso molecolare esaminati.

Figura 5.10. SDS-PAGE (A) di una lesione iperplastica/displastica (lane 5), di un carcinoma semplice (lane 7) e della linea cellulare di controllo SKBR-3 (lane 9); i rettangoli blu e rossi corrispondono alle due regioni del gel analizzate in spettrometria di massa. B: Distribuzione schematica dei peptidi identificati (in verde) nelle cellule SKBR-3 all'interno della sequenza aminoacidica della proteina HER2 dell'uomo.



5.4 Discussione

L'oncogene *ERBB2* ed il suo prodotto proteico HER2 risultano amplificati o sovraespressi nel 10% - 34% dei carcinomi al seno della donna (Ross et al., 2009). La sovraespressione dell'oncoproteina determina un aumento della proliferazione cellulare, un'inibizione dei meccanismi di apoptosi ed un aumento delle capacità di metastatizzazione delle cellule neoplastiche, caratteristiche, queste, associate ad una riduzione dei tempi di sopravvivenza in pazienti affetti da carcinoma al seno HER2+ (Zhou & Hung, 2003; Park et al., 2008).

Accanto al ruolo di marcatore prognostico, l'HER2 è considerato un marcatore terapeutico grazie allo sviluppo di agenti farmacologici in grado di inibire la cascata di segnali molecolari attivati da questa glicoproteina e di aumentare i tempi di sopravvivenza nelle donne affette da carcinoma mammario (Hudis, 2007; Ross et al., 2009; Tebbutt et al., 2013).

Anche in medicina veterinaria, vista l'importanza dell'HER2 nella donna, sono stati condotti numerosi studi volti a stabilire il ruolo rivestito da questo recettore nel processo carcinogenetico e soprattutto nei tumori mammari del cane.

Dalla letteratura emergono, tuttavia, dei risultati contrastanti sulla correlazione dell'espressione del recettore HER2 con i vari parametri clinico-patologici indicativi di un comportamento biologico aggressivo dei CMT, e sul potenziale valore attribuito a questa oncoproteina come marcatore prognostico.

In quest'ottica, questo lavoro ha esaminato l'espressione genica e proteica di *ERBB2*/HER2 con tecnologie molecolari convenzionali (IHC, WB, RPPA) ed innovative (qRT-PCR e GeLC-MS/MS), con lo scopo di approfondire il reale significato dell'espressione dell'oncogene nelle lesioni mammarie del cane.

Alla valutazione immunohistochimica, il 22% dei carcinomi invasivi ha mostrato una sovraespressione della proteina HER2 (punteggio 3+). Il punteggio 2+, indicativo di un risultato dubbio, è stato invece attribuito al 22% dei carcinomi, al 66% delle lesioni iperplastiche/displastiche ed al singolo caso di carcinoma *in situ*.

Vista l'ampia variabilità tra gli studi riguardanti l'espressione dell'HER2 nelle lesioni mammarie del cane, i dati ottenuti in questo lavoro appaiono sufficientemente sovrapponibili con quanto riportato dai diversi autori in letteratura veterinaria.

Infatti, la sovraespressione della proteina riscontrata nel 22% dei carcinomi invasivi risulta paragonabile ai valori riportati da altri autori (dal 17.6% al 35.4%) (Dutra et al., 2004; Kim et al., 2011).

Al contrario, la percentuale dei carcinomi invasivi con punteggio 2+ (22%) è risultata nettamente inferiore a quanto riportato nei CMT (64.4%) da Dutra (2004). Questo dato tuttavia, risulta di difficile interpretazione in quanto le lesioni con punteggio 2+ vengono considerate, in contraddizione con le linee guida proposte dalla ASCO (Wolff et al., 2007), sovraesprimenti HER2 (Kim et al., 2011, Ressel et al., 2013) o semplicemente non vengono riportate (De Las Mulas et al., 2003; Hsu et al., 2009; Muhammadnejad et al., 2012).

Le lesioni iperplastiche/displastiche (66%) ed il carcinoma duttale *in situ* nel cane hanno mostrato una espressione dubbia della proteina HER2 (punteggio IHC 2+). Queste lesioni, come accennato precedentemente, sono considerate, sia nella donna che nel cane (Lopez-Garcia et al., 2010; Sleenckx et al., 2011), dei fattori di rischio per lo sviluppo del carcinoma mammario invasivo, e possono presentare mutazioni geniche in grado di determinare un'alterazione dell'espressione dei marcatori molecolari come estrogeni e progesterone, fattori di crescita (HER2), regolatori del ciclo cellulare (P53 e Bcl-2) e molecole di adesione cellulare (E-caderina) (Reis & Lakhani, 2003; Hartmann

et al., 2005; Vargo-Gogola & Rosen, 2007; Ellis, 2010; Lopez-Garcia et al., 2010). In quest'ottica, il riscontro all'IHC di un'espressione della proteina HER2, seppure di dubbia interpretazione, tenderebbe ad avvalorare la teoria di una possibile evoluzione, anche nel cane, di queste lesioni verso forme neoplastiche invasive, coerentemente con quanto riportato da Antuofermo (2007) e da Ressel (2013).

Ciò nonostante, la mancanza di differenze statisticamente significative tra le lesioni benigne, maligne ed iperplastiche, come peraltro riportato precedentemente da Kim (2011), suggerisce un limitato coinvolgimento dell'oncogene HER2 nel processo carcinogenetico dei CMT.

Recentemente, metodiche di biologia molecolare come la qRT-PCR sono state proposte per lo studio dei profili genici di specifici marcatori tumorali da utilizzare in associazione o come alternativa alle metodiche di IHC (Nistor et al., 2006).

Questa tecnica è basata sostanzialmente sull'utilizzo di sonde fluorogeniche e di primers specifici in grado di legarsi selettivamente a sequenze complementari del gene di interesse. Ne deriva un'alta specificità e sensibilità della qRT-PCR nel riconoscere e quantificare eventuali variazioni di espressione genica all'interno delle differenti classi dei campioni esaminati.

Proprio per le sue caratteristiche, la qRT-PCR è stata frequentemente utilizzata per verificare lo status di *ERBB2* nel cancro al seno della donna (Nistor et al., 2006; Ross et al., 2011), mentre, è stata impiegata solo raramente nella valutazione dell'oncogene nei CMT (Matsuyama et al., 2001; Klopffleisch et al., 2010).

Nel nostro studio, i livelli di espressione dell'mRNA di *ERBB2* hanno mostrato un incremento dell'espressione genica di 4 e 5 volte superiore, rispettivamente, negli adenomi e nei carcinomi semplici rispetto alla mammella sana, indicando una aumentata sintesi dell'mRNA nelle forme neoplastiche. Tuttavia, pur osservando un

tendenziale aumento dell'espressione di *ERBB* nelle lesioni iperplastiche, negli adenomi e nei carcinomi semplici, in accordo con quanto riportato da Klopfleisch (2010), non sono state osservate differenze statisticamente significative tra neoformazioni benigne e maligne, suggerendo, anche in questo caso, un ruolo marginale dell'oncogene nei CMT. Questo dato appare ulteriormente confermato dalla mancanza di una correlazione tra i risultati immunohistochimici e quelli ottenuti in qRT-PCR. Ad esempio, i due carcinomi considerati sovraesprimenti la proteina (punteggio IHC 3+) hanno mostrato una estrema variabilità nell'espressione relativa di RNA (valori di *FC* di 7.26 ± 0.12 e 0.43 ± 0.14).

Diversi studi hanno dimostrato che i livelli di trascritto (mRNA) non necessariamente presentano una correlazione con i livelli di espressione proteica, sostanzialmente a causa della presenza di modificazioni post-traduzionali in grado di influenzare l'emivita, la stabilità e l'attività delle proteine (Vogel & Marcotte, 2012; Kocevar et al., 2013).

Tuttavia, in questo studio, la mancanza di una corrispondenza tra le due metodiche è attribuibile, verosimilmente, alla scarsa specificità dell'anticorpo utilizzato nel riconoscere la proteina HER2 del cane, come dimostrato dalla presenza di un'inattesa positività citoplasmatica, riscontrata in tutte le lesioni esaminate alla valutazione immunohistochimica. L'eterogeneità della colorazione osservata in IHC, considerata sia nella donna che nel cane come un artefatto imputabile a fattori preanalitici o analitici, non sembra essere legata alla metodica immunohistochimica in quanto la ripetizione della stessa durante la standardizzazione del protocollo ha portato a risultati del tutto analoghi.

A confermare l'ipotesi di una scarsa specificità dell'anticorpo è l'assenza, nell'analisi dei campioni con tecnica Western Immunoblotting, della banda di 138 kDa

corrispondente al peso molecolare di HER2 nei tessuti e nelle lesioni mammarie del cane e la presenza di segnali aspecifici di peso molecolare più basso (tra 50 e 60 kDa).

Vista l'esistenza di una differenza dell'8% nella sequenza aminoacidica tra la proteina HER2 canina e l'ortologa umana (Singer et al. 2012), si potrebbe supporre che l'anticorpo diretto contro la proteina umana *c-erbB-2* si leghi alla regione della proteina del cane dove sono presenti le maggiore differenza tra le due specie (tra gli aminoacidi 1100 e 1200) e che il segnale aspecifico, osservato sia in IHC che in WB, sia conseguente al legame con epitopi dei vari recettori ErbB, vista l'elevata omologia esistente tra i membri di questa famiglia (Schrohl et al., 2011).

Per verificare queste ipotesi, i campioni di tessuto mammario che hanno mostrato l'espressione del segnale più intensa nelle metodiche basate sul legame antigene-anticorpo, sono state selezionate per una valutazione in spettrometria di massa.

L'analisi GeLC-MS/MS dei campioni mammari del cane non ha mostrato la presenza di peptidi appartenenti ad HER2 ed in generale alla famiglia dei recettori ErbB, sostanzialmente indicando che nei campioni neoplastici la proteina non è sovraespressa e rafforzando il concetto di aspecificità dell'anticorpo policlonale *anti- c-erbB-2* nel rilevare l'oncoproteina HER2 nei CMT.

Come accennato in precedenza, spesso la letteratura veterinaria ha prodotto dei risultati opposti sul ruolo giocato dall'HER2 nel processo carcinogenetico mammario del cane. I risultati del nostro lavoro forniscono una probabile spiegazione imputabile alla limitata specificità dell'anticorpo policlonale utilizzato da numerosi autori nella valutazione del recettore HER2 nei CMT (Rungsipat et al., 1999; De Las Mulas et al., 2003; Dutra et al., 2004; Hsu et al., 2009; Muhammadnejad et al., 2012; Singer et al., 2012; Ressel et al., 2013). Unicamente il lavoro effettuato da Kim (2011), nel quale viene utilizzato un ulteriore clone anticorpale (*mouse anti-HER-2 antibody; GeneTex*) sempre sviluppato

per riconoscere la proteina umana, potrebbe fornire, in questo contesto, dei risultati attendibili. L'autore riporta, infatti, la mancanza di un'associazione tra l'espressione dell'HER2 e i fattori prognostici nei CMT, tuttavia, anche in questo caso, non viene valutata la specificità e l'eventuale cross-reaione in Western immunoblotting dell'anticorpo utilizzato con i tessuti del cane.

Le analisi genomiche (qRT-PCR) e proteomiche (GeLC-MS/MS) condotte nel nostro studio suggeriscono un ruolo marginale, in relazione al numero di campioni esaminati, dell'*ERBB2*/HER2 durante l'evoluzione del processo carcinogenetico mammario nel cane.

Studi futuri effettuati su un maggior numero di campioni con anticorpi specie-specifici appaiono necessari al fine di rilevare in maniera selettiva l'HER2 e di valutare la sensibilità e specificità dell'oncoproteina come marcatore tumorale nelle neoplasie mammarie del cane.

5.5 Conclusioni

Negli animali domestici si è assistito, spesso, alla traslazione *in toto* di teorie sui meccanismi patogenetici di malattie riscontrate nell'uomo, non considerando l'esistenza di possibili, ed ormai certe, differenze intrinseche tra le specie (Klopfleisch & Gruber, 2011).

I risultati di questo studio enfatizzano il valore delle tecnologie molecolari innovative come le tecniche di proteomica e di qRT-PCR nell'identificazione e validazione di marcatori tumorali in oncologia veterinaria. In particolare, attraverso queste tecniche è stato possibile valutare l'espressione dell'*ERBB2/HER2* nelle lesioni mammarie del cane, sostanzialmente confutando il valore di numerosi studi precedentemente condotti sul ruolo svolto da questo oncogene nel processo di carcinogenesi mammaria.

Questi risultati accentuano la necessità dell'utilizzo di criteri standard nella validazione oggettiva di marcatori tumorali qualora siano adoperati per fini diagnostici, prognostici e terapeutici nel campo dell'oncologia veterinaria.

6. Identificazione e validazione di marcatori tumorali nelle neoplasie mammarie del cane

6.1 Introduzione

Le tecniche proteomiche sviluppate nel corso degli ultimi 30 anni hanno consentito di stabilire l'identità, la struttura, le funzioni biochimiche e le interazioni di numerose proteine presenti nei tessuti e nelle cellule (Tyers & Mann, 2003). Gli studi effettuati sul proteoma dei tessuti neoplastici stanno assumendo, in questo contesto, un ruolo predominante nella ricerca oncologica grazie alla capacità di queste tecniche di identificare e quantificare le proteine direttamente dai tessuti patologici (Guo et al., 2006). Una delle funzioni principali della proteomica applicata allo studio delle neoplasie nell'uomo è quella di individuare dei marcatori tumorali in grado di diagnosticare la presenza del cancro, di prevedere la capacità di risposta dei tessuti neoplastici alle terapie e di essere utili nello stabilire una prognosi (Kocevar et al., 2013).

In medicina veterinaria, come recentemente riportato da Ceciliani (2013), l'applicazione delle tecniche di proteomica per lo studio delle patologie degli animali domestici ha trovato una limitata applicazione sia per il suo costo elevato sia per la presenza di un numero ridotto di informazioni disponibili con cui poter confrontare i dati sperimentali ottenuti. Tuttavia, l'applicazione di metodologie proteomiche applicate allo studio delle malattie degli animali consentirebbe di identificare le pathways molecolari implicate nel determinismo delle patologie, permettendo l'identificazione di rilevanti marcatori diagnostici, prognostici e terapeutici (Doherty et al., 2008; Klopfleisch & Gruber, 2012).

Nella seconda parte del nostro lavoro abbiamo, quindi, voluto indagare sulla reale possibilità di scoprire nuovi marcatori tumorali in grado di discriminare tra tessuto ghiandolare mammario sano e neoplastico nel cane. A tal proposito, attraverso l'analisi in Spettrometria di Massa (MS) sono state individuate alcune proteine, legate principalmente al metabolismo del glucosio e all'attività mitocondriale, risultate differenzialmente espresse nella mammella sana rispetto alla neoplastica. Successivamente, la validazione dei potenziali marcatori tumorali è stata effettuata mediante tecnica immunoistochimica (IHC) nei tessuti mammari iperplastici e neoplastici per valutare la differente espressione proteica delle lesioni implicate nel processo carcinogenetico.

6.1.2 Metabolismo del glucosio e tumori

Oltre 50 anni fa, Warburg scoprì che i tessuti neoplastici consumano maggiori quantità di glucosio rispetto ai tessuti normali (Warburg, 1956a, 1956b).

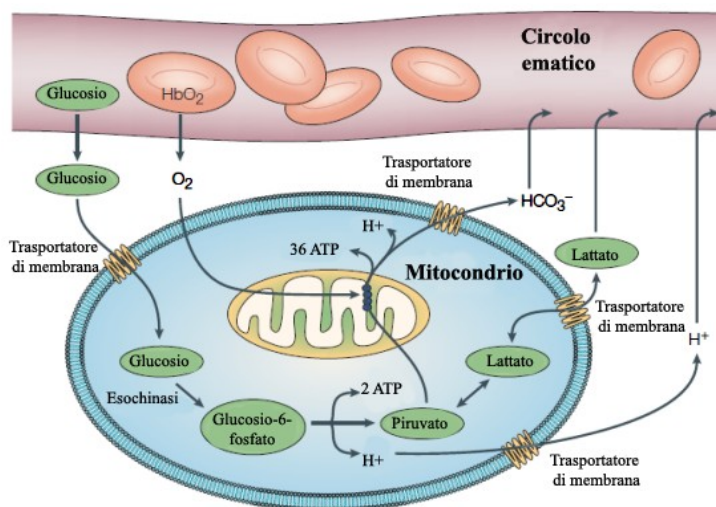
Nei tessuti normali, il glucosio, sotto forma di adenosina trifosfato (ATP), rappresenta la principale fonte di energia per il metabolismo cellulare (Alberts et al., 2002b).

Il glucosio presente nel circolo ematico viene captato dalle cellule attraverso dei trasportatori di membrana e, in assenza di ossigeno, viene fosforilato e convertito a piruvato attraverso il processo noto come *glicolisi anaerobia*. Con questo sistema si ottengono 2 molecole di ATP per molecola di glucosio. Il piruvato viene ridotto a lattato e trasportato all'esterno della cellula (Figura 6.1) (Alberts et al., 2002b; Gatenby & Gillies, 2004).

Il processo glicolitico, tuttavia, necessita di condizioni di anaerobiosi per cui in molte cellule la glicolisi è inibita dalla presenza di ossigeno. In condizioni di aerobiosi, attraverso la respirazione ossidativa, si assiste all'ossidazione del piruvato ad HCO_3 e

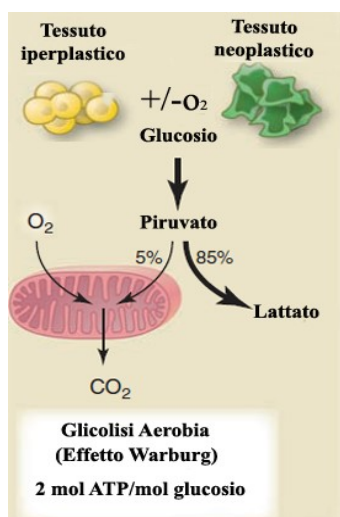
alla produzione a livello dei mitocondri di 36 molecole di ATP per molecola di glucosio degradata. Sia nella glicolisi anaerobia che nel processo di respirazione ossidativa si ha la produzione di ioni idrogeno (H^+), responsabili del processo di acidificazione dell'ambiente extracellulare (Alberts et al., 2002b; Gatenby & Gillies, 2004).

Figura 6.1. *Metabolismo del glucosio nelle cellule (modificato da Gatenby & Gillies, 2004)*



Nei tessuti neoplastici, secondo il cosiddetto *effetto Warburg*, il glucosio viene metabolizzato a piruvato e lattato attraverso la *glicolisi aerobia* sia in assenza che in presenza di ossigeno (Figura 6.2) (Warburg, 1956a, 1956b; Gatenby & Gillies, 2004; Heiden et al., 2009).

Figura 6.2. *Glicolisi aerobia (effetto Warburg) (modificato da Heiden et al., 2009)*



Seppur svantaggioso in termini di guadagno energetico, con produzione di 2 molecole di ATP per glucosio, a fronte delle 36 prodotte dalla respirazione ossidativa, *l'effetto Warburg* ed il potenziamento della via glicolitica sono fondamentali per favorire la sopravvivenza delle cellule neoplastiche sia nelle fasi iniziali sia durante l'evoluzione del processo carcinogenetico (Gatenby & Gillies, 2004).

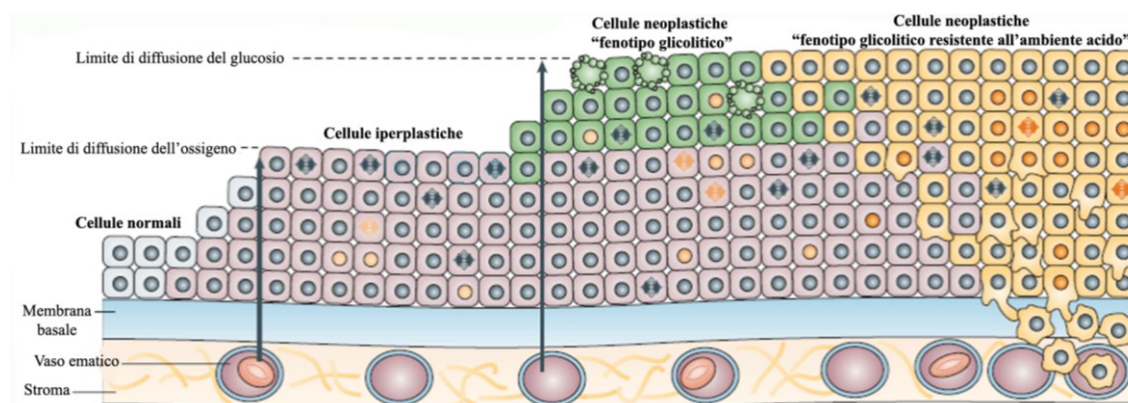
La carcinogenesi precoce, infatti, avviene in un ambiente scarsamente vascolarizzato, poiché l'epitelio iperplastico, considerato come fase iniziale del processo tumorale, è fisicamente separato dallo stroma vascolarizzato dalla membrana basale. In quest'ottica, i substrati come l'ossigeno ed il glucosio per essere metabolizzati dalle cellule devono diffondere dai vasi attraverso la membrana basale. Il processo di diffusione dell'ossigeno dai vasi capillari mostra, tuttavia, dei limiti di propagazione quantificabili in una distanza massima di 100 - 150 μm (Figura 6.3) (Krogh, 1919; Dewhirst et al., 1994; Helmlinger et al., 1997; Gatenby & Gillies, 2004).

Le cellule iperplastiche, continuando a proliferare ed assumendo un fenotipo neoplastico, si allontanano progressivamente dalle riserve ematiche di ossigeno, tendendo, quindi, a potenziare la glicolisi per la produzione di energia (Gatenby & Gillies, 2004). Tuttavia, il potenziamento di questa via metabolica, se da un lato consente alle cellule l'adattamento ad una condizione di ipossia, dall'altro tende a far aumentare la produzione di ioni idrogeno (H^+) con un sostanziale abbassamento del pH nell'ambiente extracellulare (Gatenby & Gillies, 2004; Heiden et al., 2009).

La prolungata esposizione ad un ambiente acido, tipicamente, sfocia in fenomeni apoptotici mediati dalla P53 e dalla caspasi-3 (Graeber et al., 1996; Park et al., 1999; Williams et al., 1999), ma, nel contempo, tende a selezionare dei cloni cellulari neoplastici in grado di sviluppare meccanismi che stabilizzano il pH intracellulare (Gatenby & Gillies, 2004). L'acquisizione di un fenotipo glicolitico capace di adattarsi

alle condizioni d'ipossia ed ad un ambiente acido favorisce il processo di metastatizzazione sia per la degradazione delle componenti della matrice extracellulare e conseguente rottura della membrana basale (Rozhin et al., 1994.; Montcourrier et al., 1997), sia perché durante la migrazione in capillari e arteriole precapillari, le cellule neoplastiche vanno incontro a episodi di ipossia o anossia (Figura 6.3) (Gatenby & Gillies, 2004).

Figura 6.3. Modello delle interazioni tra cellule iperplastiche e neoplastiche durante l'evoluzione del processo carcinogenetico e limiti di diffusione dell'ossigeno e del glucosio (modificato da Gatenby & Gillies, 2004)



La dimostrazione dell'importanza dell'*effetto Warburg* e quindi della necessità di alti livelli di glucosio nella progressione neoplastica ha consentito di ipotizzare che l'inibizione della via glicolitica, e conseguentemente della generazione di ATP, potesse essere un'efficace strategia per lo sviluppo di terapie anti-tumorali (Munoz-Pinedo et al., 2003; Xu et al., 2005).

Inoltre, la rapida captazione del glucosio da parte delle cellule tumorali è alla base della Tomografia ad Emissione di Positroni (PET), tecnica diagnostica in grado di rilevare con elevati valori di specificità sia le neoplasie primarie che quelle metastatiche (Gambhir, 2002). In questa tecnica viene utilizzato come tracciante un analogo del glucosio, il ^{18}F fluorodeossiglucosio (FdG), che captato dalle cellule neoplastiche produce

un segnale visualizzabile in neoplasie di dimensioni inferiori al centimetro (Gatenby & Gillies, 2004).

L'incremento del fabbisogno e quindi della disponibilità di glucosio nelle cellule tumorali consente l'attivazione di un'ulteriore via metabolica, nota come *via dei pentoso fosfati (PPP)*, in grado di produrre ribosio necessario per la sintesi degli acidi nucleici, e nicotinamide adenina dinucleotide fosfato ridotta (NADPH) necessaria per le biosintesi riduttive o per contrastare gli effetti dannosi dei radicali liberi (Wittig & Coy, 2008; Cairns et al., 2011)

La *via dei pentoso fosfati* si può dividere in due fasi: una fase ossidativa e una non ossidativa

1. Nella fase ossidativa il glucosio 6-fosfato viene ossidato a 6-fosfogluconato della glucosio 6-fosfato deidrogenasi (G6PD). Il coenzima della G6PD è il NADP⁺ che viene ridotto a NADPH. Il 6-fosfogluconato che si forma subisce una decarbossilazione ossidativa con formazione di ribulosio 5-fosfato, CO² e NADPH
2. Nella fase non ossidativa si assiste alla formazione di ribulosio 5-fosfato e di zuccheri (fruttosio 6-fosfato e gliceraldeide 3-fosfato) che possono essere metabolizzati nella glicolisi per la produzione di ATP o riprendere il ciclo dei pentoso fosfati grazie all'azione dell'enzima transchetolasi.

La produzione di NADH attraverso la via dei pentoso fosfati riveste un ruolo cruciale nella regolazione e nella riduzione dei ROS (*Reactive Oxygen Species*) in grado di determinare un effetto citotossico per le cellule neoplastiche, mentre la produzione di ribosio-5-fosfato a partire dal ribulosio 5-fosfato nelle cellule tumorali è necessario per la biosintesi degli acidi nucleici (Boros et al., 1997; Wittig & Coy, 2008; Cairns et al., 2011).

L'inibizione della via dei pentoso fosfati, considerata cruciale nel metabolismo delle cellule tumorali, attraverso l'utilizzo di molecole ad azione farmacologica ha consentito di limitare la proliferazione di culture cellulari neoplastiche, rendendo questa via metabolica ed in particolare l'enzima transchetolasi un target terapeutico particolarmente studiato (Rais et al., 1999; Ramos-Montoya et al., 2006).

6.1.3 Transchetolasi (TKT)

Nell'uomo, il gene *TKT*, localizzato nel cromosoma 3p14.3, codifica per una proteina da 68 kDa detta transchetolasi (TKT).

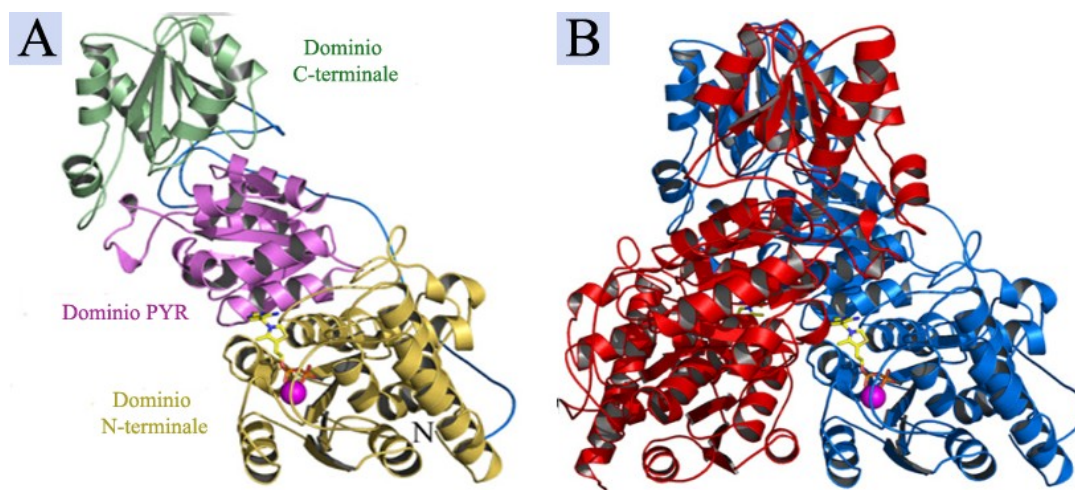
La transchetolasi, appartenente alla famiglia delle transferasi, è un enzima tiamina-difosfato dipendente (ThDP) che catalizza una reazione reversibile mediante il trasferimento di un frammento di due atomi di carbonio da un chetoso ad un aldoso (Kochetov, 1986; Schorken & Sprenger, 1998; Schenk et al., 1998.). Nella *via dei pentoso fosfati*, la TKT rappresenta il fattore limitante della conversione del glucosio a ribulosio, che come accennato, rappresenta lo zucchero essenziale per la sintesi degli acidi nucleici (Wittig & Coy, 2008; Cairns et al., 2011).

Le prime informazioni sulla struttura cristallina e sulle funzioni dell'enzima transchetolasi possono essere fatte risalire al 1955, quando De la Haba (1955) dimostra la presenza della TKT nel lievito di birra.

Da allora sono state condotte numerose ricerche sulla funzione dell'enzima che appare estremamente conservato durante l'evoluzione visto il suo ruolo cruciale nella *via dei pentoso fosfati* (Zhao & Zhong, 2009). Gli studi condotti su *E. Coli* e *S. Cerevisiae*, recentemente confermati nell'uomo, hanno consentito di dimostrare che strutturalmente la TKT è una proteina dimerica composta da due monomeri di circa 68 kDa, che mostrano un dominio N-terminale in grado di legare la porzione fosforilata della

tiamina difosfato (ThD), un dominio pirimidinico in grado di legare la porzione aminopirimidinica della ThD (PYR) ed un dominio C-terminale (Figura 6.4) (Turner, 2000; Mitschke et al., 2010, Meshalkina et al., 2013)

Figura 6.4. *Struttura cristallina monomerica (A) e dimerica (B) della Transchetolasi (modificato da Mitschke et al., 2010)*



Come precedentemente accennato, i tessuti neoplastici necessitano di un aumento della disponibilità e dell'attività dell'enzima transchetolasi, considerando che oltre l'85% del ribosio necessario per la sintesi degli acidi nucleici è ottenuto attraverso l'attivazione della *via dei pentoso fosfati* (Boros et al., 1997). Questa considerazione ha portato allo sviluppo di molecole ad azione farmacologica che, limitando l'attività della TKT, bloccano l'attività proliferativa cellulare neoplastica (Rais et al., 1999; Thomas et al., 2008; Lin et al., 2011; Wang et al., 2013).

Oltre alla proteina TKT, sono note altre due proteine strutturalmente molto simili con un'omologia nella sequenza aminoacidica del 61% e del 66%, note come Transchetolasi like 1 e 2 (TKTL-1 e TKTL-2) (Mitschke et al., 2010; Meshalkina et al., 2013). A differenza della TKT, il cui ruolo come enzima nella fase non ossidativa della *PPP* è noto, le funzioni e le proprietà biochimiche della TKTL-2 sono sconosciute, mentre quelle riportate per la TKTL-1 appaiono contrastanti (Mitschke et al., 2010). Infatti, nel

1996, Coy riporta una differenza di 38 aminoacidi tra la sequenza di TKT e TKTL-1 a livello del dominio N-terminale, dimostrando, prima, una limitata attività enzimatica della proteina e successivamente la completa funzionalità transchetolasica (Coy et al., 2005). Recentemente, la caratterizzazione della struttura cristallina ed esperimenti di clonaggio hanno confermato la mancanza del sito di ancoraggio per la tiamina, suggerendo, quindi, l'assenza di attività enzimatica ed un limitato ruolo nella *PPP* (Mitschke et al., 2010; Schneider et al., 2012, Meshalkina et al., 2013).

Tuttavia, Zastre (2013) ha proposto che la TKTL-1, pur essendo enzimaticamente inattiva come omodimero, possa svolgere la sua attività enzimatica attraverso la formazione di eterodimeri con le altre isoforme TKT. La mancanza del dominio N-terminale in grado di legare la porzione fosforilata della tiamina difosfato, infatti, non esclude che altri derivati della tiamina, strutturalmente diversi dalla vitamina, possano comunque legarsi all'eterodimero consentendone l'attivazione (Zastre et al., 2013).

Anche se i risultati sulla funzione biologica della TKTL-1 appaiono estremamente contrastanti, l'espressione di questa proteina è stata spesso associata a differenti patologie.

A partire dal 2005, anno in cui Coy riporta una alterata espressione della TKTL-1 in patologie neurodegenerative, nel diabete e nel cancro, si sono susseguiti una serie di studi che hanno dimostrato un aumento dell'espressione del gene e del suo prodotto proteico in numerose forme epiteliali neoplastiche a carico dello stomaco (Staiger et al., 2006), del rene, del colon (Langbein et al., 2006), dell'ovaio (Krockenberger et al., 2007), del nasofaringe (Zhang et al., 2008), della cervice uterina (Chen et al., 2009) e dei polmoni (Schultz et al., 2008; Fritz et al., 2012). In questi studi la sovraespressione della TKTL-1 è stata spesso correlata con parametri prognostici indicativi di un

comportamento biologico maligno e con tempi ridotti di sopravvivenza nei pazienti affetti da queste neoplasie.

Anche nel cancro al seno della donna è stato descritto un aumento dell' espressione proteica della Transchetolasi like-1 (Foldi et al., 2007; Schultz et al., 2008; Schmidt et al., 2010).

In particolare, Foldi (2007) riporta un'espressione della TKTL-1, correlata alla sovraespressione dell'oncoproteina HER2, nell'86% dei carcinomi invasivi della donna, con valori statisticamente superiori a quelli rilevati nella mammella sana. Questo dato è stato recentemente confermato da Schmidt (2010), che in uno studio volto a valutare l'espressione della proteina chinasi B (Akt), del glucotrasportatore di tipo 1 (GLUT1), della TKTL-1 e dell'isoenzima piruvato chinasi M2 (M2PK), riscontra una espressione statisticamente superiore della TKTL-1 nei carcinomi invasivi e nel carcinoma *in situ* rispetto alla mammella sana.

Gli studi condotti sulle varie neoplasie dell'uomo dimostrano, quindi, che la TKTL-1 rappresenta un valido marcatore tumorale prognostico e suggeriscono l'importanza dello sviluppo di farmaci che, bloccando l'azione della TKTL-1, sono in grado di limitare la proliferazione cellulare neoplastica.

In medicina veterinaria non è stato effettuato nessuno studio che metta in relazione i livelli di espressione della TKT e della TKTL-1 con le lesioni mammarie del cane.

6.1.4 Proibitine

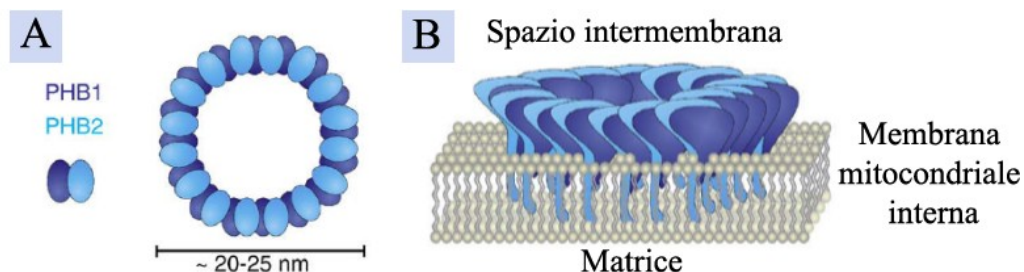
Nell'uomo, il gene *PHB1*, localizzato nel cromosoma 17q2, codifica per una proteina di circa 30 kDa nota come Proibitina 1 (PHB1), mentre il gene *PHB2*, localizzato nel cromosoma 12p13, codifica per la Proibitina 2 (PHB2) di circa 33 kDa (Mishra et al., 2006).

Le due proteine, altamente omologhe e con una identità del 50% tra i residui aminoacidici, sono conservate tra le specie e si localizzano prevalentemente nella membrana mitocondriale interna dove agiscono da chaperones molecolari in grado di mantenere la morfologia mitocondriale e di stabilizzare le subunità di nuova sintesi degli enzimi respiratori mitocondriali (Steglich et al., 1999; Coates et al., 2001; Nijtmans et al., 2002; Kasashima et al., 2006; Mishra et al., 2006; Merkwirth & Langer, 2009).

Strutturalmente queste proteine mostrano una porzione idrofobica amino terminale che consente l'ancoraggio delle proteine alla membrana interna mitocondriale, una regione nota come dominio PHB ed un dominio *coiled-coil* nella porzione carbossiterminale, cruciale per l'assemblaggio dei complessi formati da PHB1/PHB2 (Merkwirth & Langer, 2009).

Recenti studi hanno dimostrato che la struttura multicentrica ad anello di circa 20–25 nm formata dalla dimerizzazione tra PHB1 e PHB2 rappresenta l'unità funzionale attiva in grado di svolgere l'azione di chaperon molecolare a livello mitocondriale (Figura 6.5) (Merkwirth & Langer, 2009). Questo dato viene provato dal fatto che la delezione del gene *PHB1* porta alla perdita di entrambi le unità proteiche sostanzialmente a causa di un'aumentata degradazione di una delle due proteine in assenza dell'altra, rendendo il complesso proteico funzionalmente inattivo (Coates et al., 2001; Nijtmans et al., 2002; Merkwirth & Langer, 2009).

Figura 6.5. Rappresentazione schematica della struttura multicentrica formata dalla dimerizzazione tra PHB1 e PHB2 (A) e sua localizzazione nella membrana mitocondriale interna (B)(modificato da Merkwirth & Langer, 2009)



Come accennato in precedenza, le cellule neoplastiche tendono ad aumentare, attraverso la via dei pentoso fosfati, la produzione di NADH in grado di regolare l'effetto citotossico dovuto ai ROS. E' stato dimostrato, in quest'ottica, che l'aumento dell'espressione delle proibitine consente di ridurre la produzione di radicali liberi limitando l'effetto citotossico dei ROS ed aumentando quindi la capacità proliferativa delle cellule neoplastiche (Vessal et al., 2006; Theiss & Sitaraman, 2011; Zhou & Qin, 2013).

Le proibitine appaiono fondamentali nello sviluppo embrionale di *C. elegans* (Sanz et al., 2003) e svolgono un importante ruolo nella proliferazione cellulare come dimostrato dal fatto che il silenziamento del gene *PHB2* determina una perdita del complesso proteico PHB1/PHB2 ed una riduzione della proliferazione cellulare di fibroblasti di topo (Merkwirth et al., 2008).

Oltre alla localizzazione a livello mitocondriale, le proibitine sono localizzate nel nucleo e nella membrana plasmatica, dove, direttamente o indirettamente attraverso l'attivazione ed il potenziamento di vie metaboliche, controllano numerose funzioni cellulari.

E' stato dimostrato, infatti, che queste proteine sono in grado di regolare il ciclo cellulare attraverso l'aumento dell'attività della P53 e della proteina del retinoblastoma

(Rb) (Nuell et al., 1991; Wang et al., 1999, 2002; Fusaro et al., 2003), di inibire l'attività trascrizionale del recettore dell'estrogeno (Montano et al., 1999; Kasashima et al., 2006), di modulare l'adesione epiteliale (Rajalingam et al., 2005) e di agire come recettore di membrana (Terashima et al., 1994; Mengwasser et al., 2004).

Il ruolo delle proibitine nel processo carcinogenetico appare, tuttavia, estremamente controverso, infatti se da un lato giocano un ruolo anti-tumorigenico, potenziando i meccanismi di controllo cellulare e apoptotici mediati da P53 e Rb, dall'altro diversi autori dimostrano che queste proteine sono necessarie per la proliferazione cellulare neoplastica. Come riportato da Sievers (2010), infatti, un incremento dell'espressione delle proibitine consente un aumento della proliferazione neoplastica associato ad una perdita delle molecole di adesione cellulare favorendo quindi il processo metastatico. Questo dato sembra sostanzialmente imputabile al potenziamento da parte di queste proteine della via metabolica RAF-MEK-ERK, attraverso il controllo di Ras, coinvolta nella crescita cellulare e nella trasformazione maligna delle cellule (Rajalingam et al., 2005; Rajalingam & Rudel, 2005)

Ad avvalorare questa tesi, il fatto che la sovraespressione prevalentemente della PHB1, ma anche della PHB2 (Coates et al., 2001), riscontrata in neoplasie a carico dello stomaco (Ryu et al., 2003), della cervice (Tsai et al., 2006), della vescica (Wu et al., 2007), della prostata (Ummanni et al., 2008), dell'esofago (Ren et al., 2010), del polmone (Guo et al., 2012) e del fegato (Cheng et al., 2013) sia spesso associata a parametri prognostici infausti e a ridotti tempi di sopravvivenza nei pazienti affetti da queste neoplasie.

Nel cancro al seno della donna la PHB1 è stata proposta come marcatore tumorale da Dell'Orco (1997) che, in uno studio volto a comparare i livelli di espressione proteica nelle varie fasi della progressione neoplastica, ha rilevato un incremento della proibitina

all'aumentare del grado di malignità delle lesioni. Recentemente Najm (2013) ha confermato questo dato rilevando una sovraespressione della PHB1 nel 38% dei carcinomi invasivi mammari della donna, sottolineando il probabile ruolo di marcatore tumorale di questa proteina nel cancro al seno della donna.

Attualmente, in medicina veterinaria non esistono studi che valutino l'espressione proteica delle proibitine nelle lesioni mammarie del cane.

6.2 Materiali e Metodi

Raccolta dei campioni

In questo studio sono stati presi in considerazione 37 campioni di tessuto mammario sano e neoplastico, pervenuto negli anni dal 2010 al 2013 al Laboratorio di Diagnostica Patologica Veterinaria del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Sassari.

Il materiale conservato “fresco”, ottenuto in seguito a mastectomia, proveniva da 35 cagne, intere (33) o sterilizzate in età adulta (2), di età compresa tra i 5 ed i 15 anni ed appartenenti alle seguenti razze: meticcio (20), Yorkshire Terrier (7), Pastore tedesco (3), Bassotto tedesco (2), Pinscher (1), Labrador Retriever (1), Barbone (1).

Immediatamente dopo l'asportazione chirurgica, i campioni sono stati divisi in due aliquote speculari e sottoposti a differenti metodiche di conservazione. In particolare, porzioni di tessuto mammario sono state fissate in formalina tamponata al 10% (formaldeide al 4%) per 48 ore quando destinate a processazione istologica ed immunoistochimica, e congelate a -80°C se indirizzate alle analisi proteomiche.

Processazione istologica dei campioni e classificazione delle lesioni

I 37 campioni fissati in formalina sono stati disidratati a concentrazioni crescenti di alcoli, inclusi in paraffina, e sezionati, mediante l'utilizzo del microtomo, a 3µm di spessore. Le sezioni sono state successivamente colorate con ematossilina e eosina (E&E). La valutazione istopatologica dei tumori mammari è stata effettuata al microscopio ottico (Nikon Eclipse 80i) seguendo le linee guida della classificazione dei tumori mammari del cane e del gatto proposta dalla WHO (Misdorp et al., 1999). Le lesioni iperplastiche, quali l'iperplasia tipica (UH) ed atipica (ADH), ed il carcinoma

duttale *in situ* (DCIS) sono state classificate secondo la WHO *Classification of Tumors of the Breast* (Ellis et al., 2003) utilizzata in medicina umana e applicata precedentemente nel cane da Antuofermo (2007) e Mouser (2010).

Analisi proteomiche

Le analisi proteomiche in Spettrometria di Massa (GeLC-MS/MS) e in Western Immunoblotting (WB) sono state condotte su 6 campioni di tessuto mammario canino dal gruppo dei “ricercatori di proteomica” di Porto Conte Ricerche

I tessuti congelati a -80°C sono stati inclusi nel medium *Optimal Cutting Temperature* (Tissue-Tek®, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) e 10 sezioni seriali ottenute con un criotomo (Leica CM 1950, Heidelberg, Germania) sono state utilizzate per l'estrazione proteica.

Estrazione delle proteine ed elettroforesi

Le proteine sono state estratte incubando per 20 min a 95°C i campioni in 100 microlitri di tampone (2% di sodio dodecil solfato (SDS), 0.2 M ditiotreitolo e 20 mM Tris-HCl pH 8,8) addizionato con inibitori delle proteasi (SIGMAFAST™ Sigma, St. Louis, MO, USA). Dopo centrifugazione a 14000 x g, il surnatante è stato quantificato utilizzando un kit commerciale (EZQ fluorescente kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Analisi GeLC-MS/MS

Venticinque microgrammi di ogni estratto proteico sono stati separati elettroforeticamente (SDS-PAGE) in un gel TGX 4-20% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e colorati con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Il gel è stato frazionato in 25 parti, e le proteine contenute nei frammenti di gel sono state decolorate, ridotte, carbamidometilate, e digerite con tripsina. I peptidi così ottenuti sono stati, quindi, sottoposti a spettrometria di massa utilizzando uno spettrometro di massa nano-ESI-Q-TOF (Waters, Manchester, UK) interfacciato con un sistema di cromatografia liquida CapLC (Waters).

L'identificazione proteica è stata effettuata utilizzando il motore di ricerca Mascot, e l'abbondanza delle proteine e la loro espressione differenziale è stata stimata in relazione al numero di conte spettrali (SpC) ed al *log ratio* tra i valori di SpC (Rsc) ottenuti per ogni singola proteina nei campioni di carcinoma rispetto alle mammelle sane. I valori di Rsc 1.5 e -1.5 sono stati considerati come cut-off di espressione differenziale.

Western Immunoblotting (WB)

Gli estratti proteici separati tramite SDS-PAGE sono stati trasferiti su membrane di nitrocellulosa (HybondTM-C, GE Healthcare) per l'analisi WB. Le membrane sono state bloccate con tampone fosfato (PBS, Sigma-Aldrich) contenente lo 0.05% di Tween e il 3% di albumina sierica bovina (BSA) ed incubate *over night* con gli anticorpi primari (Tabella 6.1) opportunamente diluiti in PBS-T (0,05%) contenente BSA al 3%.

Dopo l'incubazione con gli anticorpi primari, le membrane sono state lavate ed incubate con anticorpi secondari diretti contro immunoglobuline di topo (A9044, HRP, Sigma) o di coniglio (A9169, HRP, Sigma) e diluiti 1:250.000. L'immunoreattività è stata rilevata utilizzando un substrato perossidasi chemiluminescente (Sigma-Aldrich) e visualizzato con un sistema di imaging VersaDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). L'estratto proteico ottenuto da cellule *HeLa* (fibroblasti umani derivati da carcinoma alla cervice uterina) è stato utilizzato come controllo della reazione.

Analisi immunoistochimica

I 37 tessuti mammari del cane processati per l'istopatologia sono stati sottoposti a colorazioni immunoistochimiche con un immunocoloratore semiautomatico (Sequenza, Shandon, Runcorn, Regno Unito) utilizzando la metodica avidina biotina perossidasi (ABC) associata alla tecnica di smascheramento antigenico.

Sezioni seriali di 4 µm di spessore, montate su vetrini portaoggetto caricati positivamente (Superfrost, Fisher Scientific), sono state immerse per 20 minuti in soluzione WCAP a 98°C (BiOptica, Milano, Italia), che consente lo sparaffinamento, la reidratazione e lo smascheramento antigenico. Le perossidasi endogene ed i legami non specifici sono stati bloccati, rispettivamente, con la soluzione Peroxidase-Blocking Solution (S2023, Dako, Milano, Italia), e con siero normale di cavallo al 2,5% (ImmPRESS, Vector Labs, Burlingame, CA, USA).

Le sezioni sono state, quindi, incubate *over night* a 4°C con gli anticorpi primari riportati in Tabella 6.1 e, successivamente, con un anticorpo secondario ad ampio spettro (ImmPRESS, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). La reazione è stata evidenziata tramite l'utilizzo del cromogeno 3,3 diaminobenzidina (ImmPACT DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Le sezioni sono state controcolorate con l'ematossilina di Mayer, sottoposte a disidratazione in soluzioni crescenti di alcoli e di xilene, ed infine montate in EUKITT (Fisher Scientific). I controlli negativi sono stati ottenuti sostituendo l'anticorpo primario con PBS, mentre come controlli positivi sono stati utilizzati sezioni tissutali di testicolo di cane, esprimenti la TKT e la TKTL-1, e di rene per la PHB2.

Tabella 6.1. *Anticorpi primari utilizzati in immunostochimica (IHC) ed in Western Immunoblotting (WB)*

Anticorpo	Casa produttrice	Antigene Target	Diluizione WB	Diluizione IHC
Anticorpo monoclonale Anti-Transchetolasi (ab112997)	Abcam	Transchetolasi	1/10.000	1/100
Anticorpo policlonale Anti-Transchetolasi like 1 (LS-4019)	LSBio	Transchetolasi like 1	1/5.000	1/100
Anticorpo policlonale Anti-Proibitina 2 (SC-67045)	Santa Cruz Biotechnology	Proibitina 2	1/10.000	1/150

I preparati sono stati osservati al microscopio ottico e la valutazione immunoistochimica è stata effettuata in 10 campi ad alto ingrandimento. In particolare, l'immunopositività nei confronti della Transchetolasi è stata valutata considerando il segnale nucleare, mentre la Transchetolasi like 1 e la Proibitina 2 sono state quantificate stimando il segnale citoplasmatico. L'immunopositività nei confronti dei tre anticorpi è stata graduata moltiplicando la percentuale delle cellule marcate (grado 0: nessuna cellula, 1: < 10%; 2: 11-30%; 3: 31-60%; 4: > 60%) per l'intensità del segnale (0: assente; 1: lieve; 2: moderata; 3: elevata), fornendo uno *score* di valori (*Immunoreactive score, IRS*) compresi tra lo 0 e il 12.

Analisi Statistica

Le analisi statistiche relative ai risultati di immunoistochimica sono state effettuate mediante l'utilizzo del programma Stata 11.2 (StataCorp LP) con test non parametrici quali test della correlazione di Spearman e test di Kruskal-Wallis. L'analisi post-hoc del test di Kruskal-Wallis è stata effettuata con il test di Mann Whitney. Il limite di significatività dei test è stato fissato per $P < 0.05$.

6.3 Risultati

Classificazione istologica delle lesioni

L'analisi istopatologica dei campioni ha permesso di evidenziare 31 lesioni mammarie rappresentate da 3 lesioni iperplastiche/displastiche (UH/ADH), 11 neoplasie benigne e 17 maligne. In particolare, le neoplasie sono state classificate in adenomi semplici (6) e complessi (5) ed in carcinomi semplici (11) e complessi (6). Sette carcinomi semplici erano di tipo tubulopapillare, ben differenziati (2) o moderatamente differenziati (5), quattro, invece, erano di tipo solido e scarsamente differenziati. La presenza di lesioni mammarie multiple è stata riscontrata in 2 soggetti, ed in particolare in 1 Yorkshire Terrier ed in un meticcio.

Sono stati, inoltre, campionati anche 6 tessuti ghiandolari sani, da utilizzare come controllo nei vari esperimenti.

Biomarker discovery ed analisi proteomica differenziale

Gli estratti proteici ottenuti da 3 tessuti ghiandolari sani e da 3 carcinomi semplici tubulopapillari (1 ben differenziato e 2 moderatamente differenziati) sono stati analizzati tramite un approccio GeLC–MS/MS. Ciascuna *lane* del gel è stata frazionata in 25 parti, digerita in tripsina e sottoposta ad analisi LC–MS/MS.

L'analisi in spettrometria di massa ad alta risoluzione ha consentito di identificare 516 proteine, di cui 40 sono risultate differenzialmente espresse tra tessuto mammario sano e tessuto neoplastico con valori di $R_{sc} > 1.5$ (Tabella 6.2).

Tabella 6.2. *Principali proteine maggiormente espresse nei carcinomi mammari semplici rispetto alla mammella sana.*

Identificativo UniProt*	Nome della proteina	Carcinomi/sana (valori di Rsc [#])
O75369	Filamina-B	3.1
P49951	Clatrina (catena pesante 1)	3
P86206	Heat shock protein 60 kDa	2.39
P29401	Transchetolasi	2.12
P06761	Heat shock protein 70 kDa (GRP-78)	2.11
Q5RB19	Proibitina 2	2.02
P52272	Ribonucleoproteine eterogenee nucleari M	2.01
Q258K2	Miosina-9	2.01
Q60847	Collagene alpha-1(XII)	1.98
P11247	Mieloperossidasi	1.78
P38646	Heat shock protein 70 kDa (GRP-75)	1.78
P17710	Esochinasi-1	1.78
P16086	Spectrina, catena alfa	1.78
P06576	Subunità beta dell'ATP sintasi	1.77
P03974	Reticolo endoplasmatico ATPasi (transitional)	1.75
P05141	ADP-ATP translocasi 2	1.75
P38486	Galectina-3	1.66
P23246	Fattori di splicing ricchi in prolina e glutammina	1.64
Q15149	Plectina	1.64
P19338	Nucleolina	1.64

*Universal Protein Resource; [#]Rsc: *log ratio* del numero di conte spettrali ottenuti per ogni singola proteina tra i carcinomi e le mammelle sane

In particolare, i carcinomi hanno mostrato un aumento nell'espressione di proteine deputate al legame con l'RNA quali, ad esempio, alcune isoforme delle ribonucleoproteine eterogenee nucleari e i fattori di splicing ricchi in prolina e glutammina, nonché di molecole regolatrici del processo di trasduzione del segnale come, ad esempio, i vari membri della famiglia delle heat shock proteins. Inoltre, è stata osservata una generale sovraespressione di proteine ed enzimi mitocondriali come le subunità dell'ATP sintasi, la Transchetolasi e la Proibitina 2.

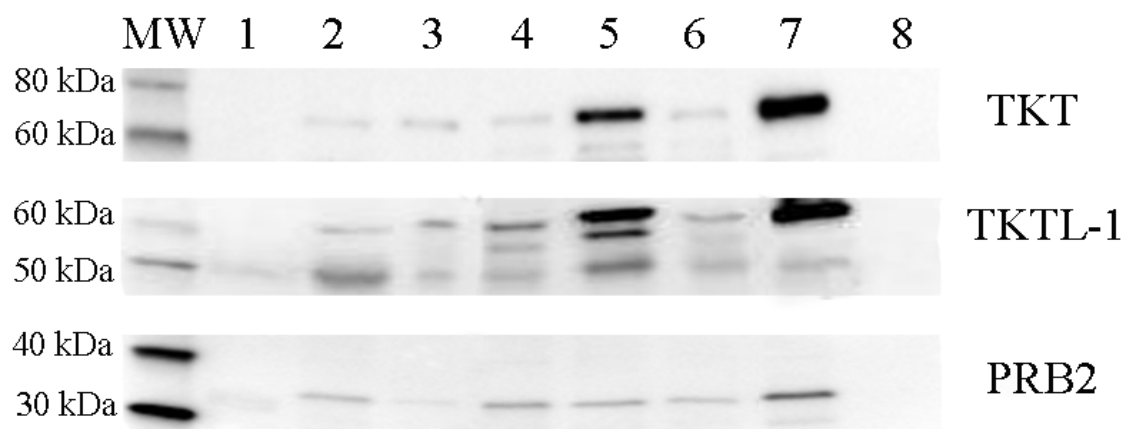
Dopo una attenta valutazione dei risultati ottenuti, i livelli di espressione delle proteine Transchetolasi, Transchetolasi like 1 e della Proibitina 2 sono stati ulteriormente

indagati nei tessuti mammari del cane mediante Western Immunoblotting (WB) ed Immunoistochimica (IHC)

Western Immunoblotting (WB)

La specificità e la cross-reattività degli anticorpi riportati in tabella 6.1 con i tessuti del cane è stata determinata con tecnica Western Immunoblotting (WB) su 3 tessuti mammari sani e su 3 carcinomi semplici tubolopapillari (1 ben differenziato e 2 moderatamente differenziati). Come atteso, sia nei campioni di tessuto mammario che nella linea cellulare di controllo *HeLa* si sono osservate al WB una banda di peso molecolare di circa 68 kDa per la TKT, una banda di circa 65 kDa per la TKTL-1, nonostante la presenza di ulteriori bande ad un peso molecolare inferiore probabilmente causate dal legame dell'anticorpo con splicing alternativi della proteina, ed una banda di circa 33 kDa per la Proibitina 2, confermando la specificità degli anticorpi primari utilizzati (Figura 6.6).

Figura 6.6. *Reattività degli anticorpi primari anti-TKT, anti-TKTL-1 e anti-Proibitina 2 nei tessuti mammari canini. Lanes 1-3 tessuti ghiandolari sani; Lanes 4-6 carcinomi semplici; Lane 7 controllo positivo (cellule Hela); Lane 8 controllo negativo (latte); MW peso molecolare (MagicMark™ XP Western Protein Standard, Invitrogen).*



Immunoistochimica

La valutazione immunoistochimica è stata effettuata sui tessuti mammari sani, sulle lesioni iperplastiche/displastiche (UH/ADH) e neoplastiche sia benigne che maligne, di tipo semplice o complesso, al fine di poter valutare i differenti livelli di espressione dei marcatori nelle varie tipologie di lesioni in una possibile progressione tumorale.

Espressione della Transchetolasi nei tessuti mammari del cane (Figura 6.7)

Il 66% dei tessuti ghiandolari sani e tutte le lesioni, sia iperplastiche/displastiche che neoplastiche, hanno mostrato una espressione nucleare della TKT con valori di immunoreattività (*IRS*) variabili a seconda degli istotipi osservati e riportati in Tabella 6.3.

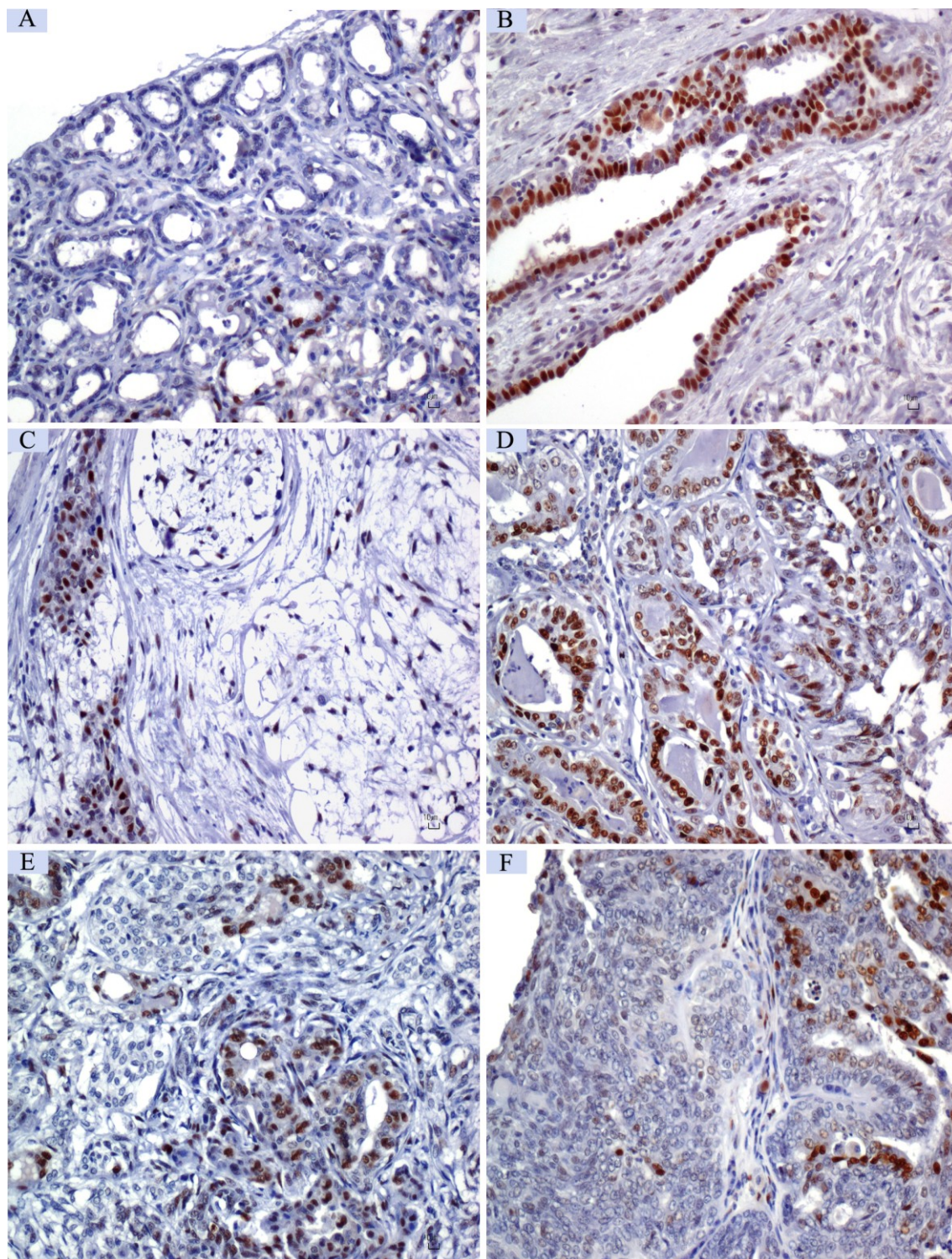
All'analisi statistica dei dati, le lesioni iperplastiche/displastiche e neoplastiche hanno mostrato un'espressione superiore rispetto alla mammella sana confermando il ruolo della TKT durante l'evoluzione del processo carcinogenetico mammario ($P < 0.001$).

A conferma del dato ottenuto in spettrometria di massa, si è osservata, inoltre, una differenza statisticamente significativa tra la mammella sana ed i carcinomi semplici esaminati ($P < 0.01$).

Tuttavia, i carcinomi semplici hanno mostrato valori di *IRS* inferiori rispetto alle lesioni iperplastiche/displastiche ed agli adenomi semplici, così come alla componente epiteliale delle forme complesse, sia maligne che benigne, indicando che negli istotipi a comportamento biologico più aggressivo probabilmente esiste una ulteriore via metabolica in grado di modulare l'espressione della proteina ($P < 0.05$).

Inoltre, i carcinomi semplici moderatamente differenziati (grado II) hanno mostrato una espressione superiore della TKT rispetto a quelli scarsamente differenziati (grado III) ($P < 0.05$).

Figura 6.7. Espressione nucleare della TKT in una ghiandola mammaria sana (A), in una lesione iperplastica (B), in un adenoma complesso (C), in un adenoma semplice (D), in un carcinoma complesso (E) ed in un carcinoma semplice (F). Contrasto Ematossilina di Mayer, bar 10 μ m



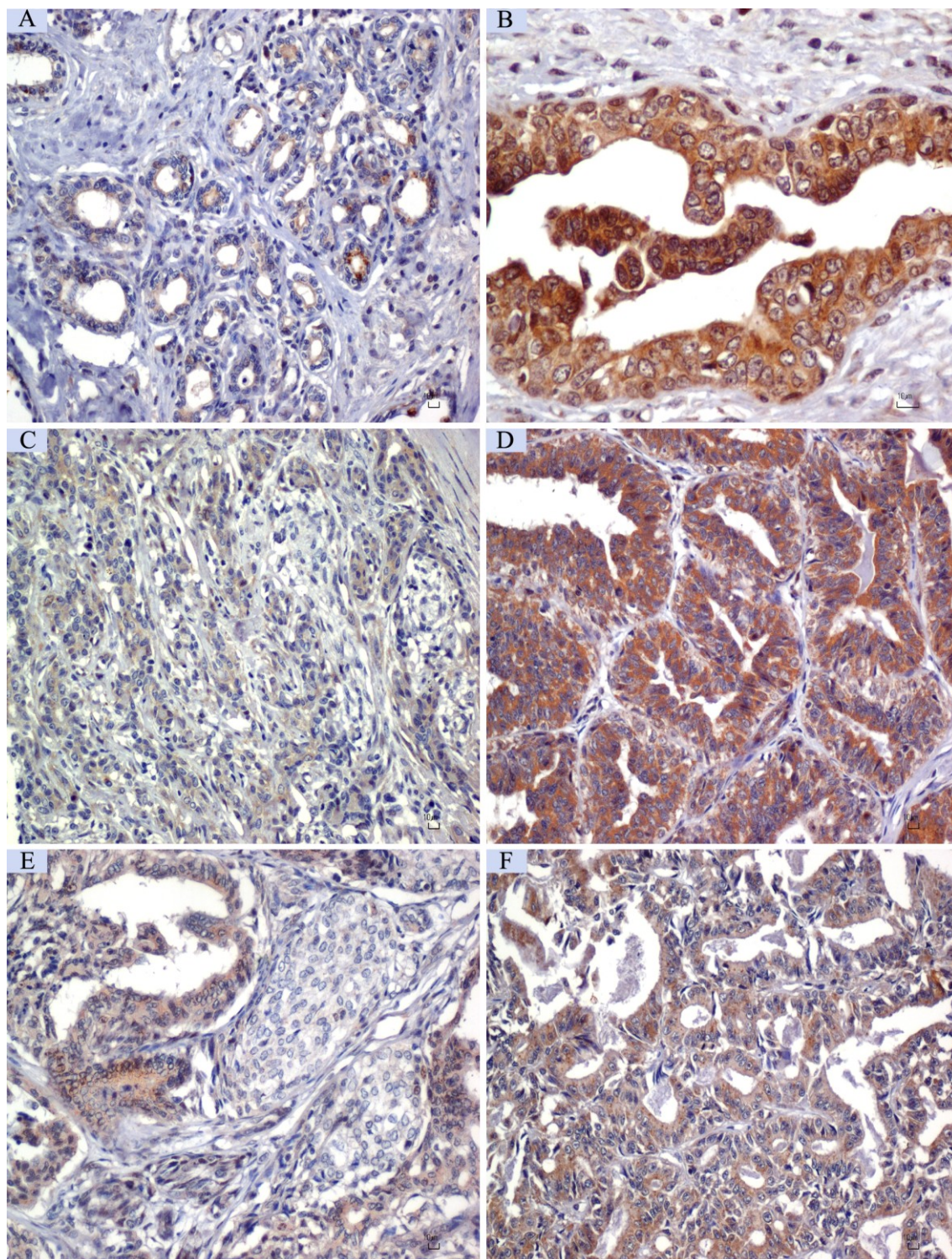
Espressione della Transchetolasi like 1 nei tessuti mammari del cane (Figura 6.8)

L'83% dei tessuti ghiandolari sani e dei carcinomi complessi, e tutte le lesioni iperplastiche/displastiche e neoplastiche hanno mostrato un'espressione citoplasmatica della TKTL-1, con valori di *IRS* variabili a seconda dell'istotipo riportati in Tabella 6.3.

All'analisi statistica dei dati, le lesioni iperplastiche/displastiche (*IRS=12*), gli adenomi semplici (*IRS=8*) ed i carcinomi semplici (*IRS=3*), hanno mostrato valori tendenzialmente superiori rispetto alla mammella sana (*IRS=1*) ($P<0.001$). Interessante notare, inoltre, come le lesioni iperplastiche/displastiche mostrino un'espressione superiore a tutte le altre lesioni considerate, sottolineando l'importanza della TKTL-1 già nelle prime fasi della trasformazione neoplastica ($P<0.001$).

Comparando l'espressione della TKTL-1 tra le varie neoplasie, si nota, inoltre, che gli adenomi ed i carcinomi semplici mostrano una espressione tendenzialmente più elevata rispetto alle forme complesse, siano esse benigne (*IRS=1*) che maligne (*IRS=1*), indicando, quindi un ruolo predominante della componente epiteliale a discapito delle componente mioepiteliale ($P<0.001$). Ad avvalorare ulteriormente questa tesi, il riscontro di un'espressione superiore negli adenomi semplici rispetto ai carcinomi complessi ($P<0.001$).

Figura 6.8. *Espressione citoplasmatica della TKTL-1 in una ghiandola mammaria sana (A), in una lesione iperplastica (B), in un adenoma complesso (C), in un adenoma semplice (D), in un carcinoma complesso (E) ed in un carcinoma semplice (F). Contrasto Ematossilina di Mayer, bar 10µm*



Espressione della Proibitina 2 nei tessuti mammari del cane (Figura 6.9)

La Proibitina 2 è risultata espressa in tutti i 37 tessuti mammari indagati con valori di *IRS* variabili a seconda degli istotipi osservati (Tabella 6.3).

All'analisi statistica dei dati, a conferma del dato ottenuto in spettrometria di massa, si è osservata una differenza statisticamente significativa tra la mammella sana (*IRS*=9) ed i carcinomi semplici esaminati (*IRS*=12) ($P<0.01$).

Comparando l'espressione della PHB2 tra le varie neoplasie, si nota, similmente a quanto osservato per la TKTL-1, un incremento dell'espressione nelle forme semplici, sia benigne (*IRS*=12) che maligne (*IRS*=12), rispetto alla mammella sana (*IRS*=9) ed alle forme complesse (*IRS*=9), indicando, anche in questo caso un prevalente ruolo della proteina nella componente epiteliale luminale. Ad avvalorare ulteriormente questa ipotesi, il fatto che le lesioni iperplastiche/displastiche mostrino un'espressione significativamente superiore rispetto agli adenomi complessi ($P<0.01$).

Figura 6.9. *Espressione citoplasmatica della PHB2 in una ghiandola mammaria sana (A), in una lesione iperplastica (B), in un adenoma complesso (C), in un adenoma semplice (D), in un carcinoma complesso (E) ed in un carcinoma semplice (F). Contrasto Ematossilina di Mayer, bar 10µm.*

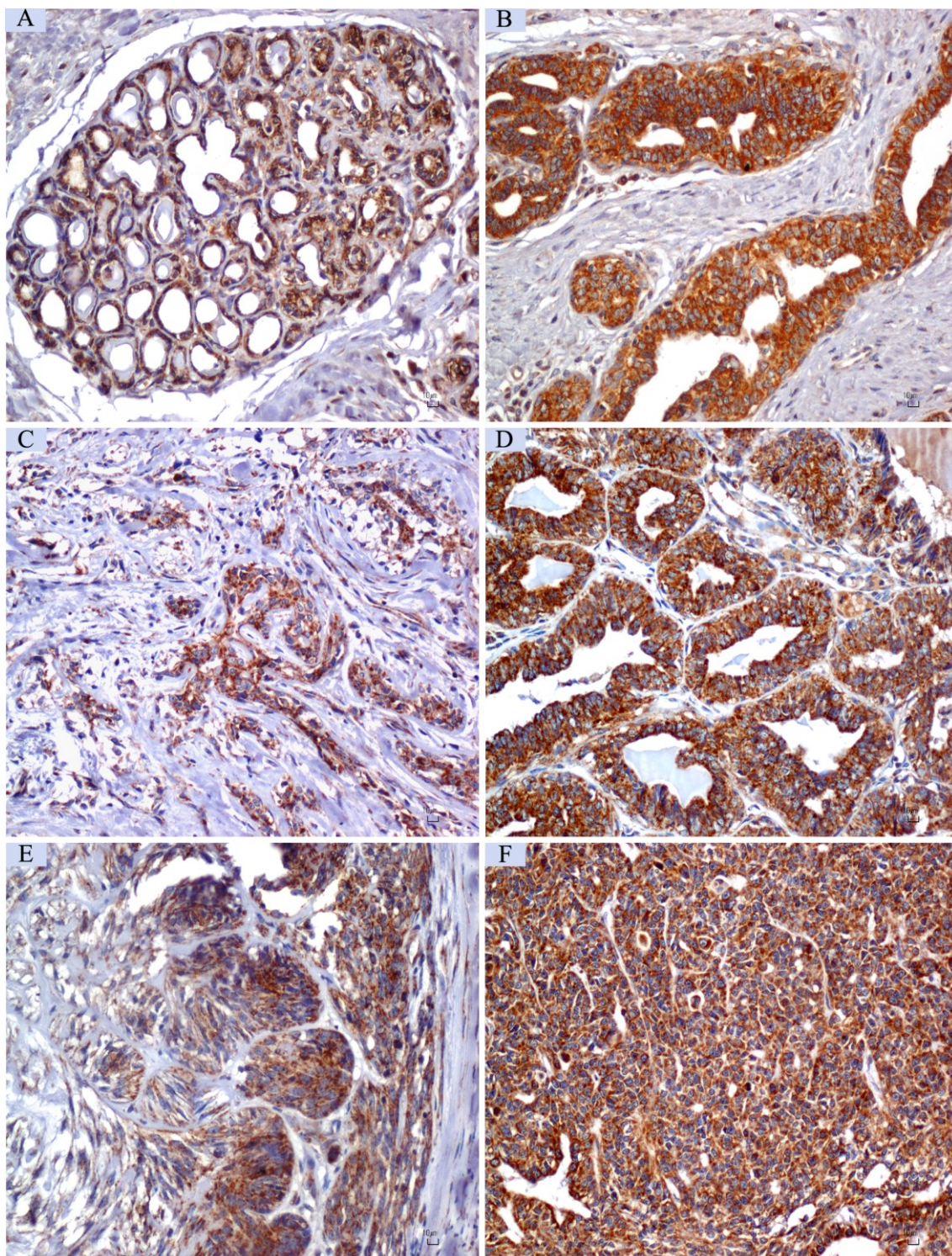


Tabella 6.3. *Casi positivi e valori mediani di espressione della TKT, TKTL-1 e PHB2 nei tessuti canini in relazione all'istotipo (IRS= Immunoreactive score).*

Istotipo	IRS TKT		IRS TKTL-1		IRS PHB2	
	N° casi positivi	Mediana (range)	N° casi positivi	Mediana (range)	N° casi positivi	Mediana (range)
Mammella sana	4/6 (66%)	0 (0-4)	5/6 (83%)	1 (1-12)	6/6 (100%)	9 (6-12)
UH/ADH	3/3 (100%)	6 (1-9)	3/3 (100%)	12 (1-12)	3/3 (100%)	12 (9-12)
Adenoma complesso	5/5 (100%)	4 (1-9)	5/5 (100%)	1 (0-6)	5/5 (100%)	9 (6-12)
Adenoma semplice	6/6 (100%)	5 (1-9)	6/6 (100%)	8 (1-12)	6/6 (100%)	12 (9-12)
Carcinoma complesso	6/6 (100%)	6 (1-12)	5/6 (83%)	1 (0-12)	6/6 (100%)	9 (6-12)
Carcinoma semplice	11/11 (100%)	1 (1-9)	11/11 (100%)	3 (1-12)	11/11 (100%)	12 (9-12)
Totale	35/37 (95%)		35/37 (95%)		37/37 (100%)	

6.4 Discussione

La proteomica applicata alla ricerca oncologica ha consentito, nell'uomo, l'identificazione di numerosi marcatori tumorali in grado di diagnosticare precocemente l'insorgenza di forme neoplastiche e lo sviluppo di target prognostici e terapeutici capaci di prevedere il decorso e la risposta terapeutica nei pazienti oncologici (Kocevar et al., 2013).

In medicina veterinaria, la proteomica è stata prevalentemente utilizzata nello studio delle patologie degli animali da reddito, mentre è stata raramente impiegata per la caratterizzazione delle alterazioni responsabili dello sviluppo di forme neoplastiche negli animali da compagnia (Ceciliani et al., 2013).

Il cancro rappresenta la principale causa di morte negli animali da compagnia e le neoplasie mammarie, in questo contesto, assumono una notevole rilevanza, essendo le forme tumorali maggiormente riscontrate nel cane (Sorenmo, 2003; Withrow, 2007).

L'applicazione di metodologie proteomiche nello studio della patologia neoplastica mammaria del cane può consentire lo sviluppo di marcatori diagnostici, prognostici e terapeutici in grado di ridurre l'insorgenza e di trattare più efficacemente questa patologia, limitando quindi lo stress e tutelando il benessere degli animali.

In questo lavoro, abbiamo identificato nel cane una serie di proteine differenzialmente espresse tra tessuto ghiandolare sano e tessuto neoplastico mammario attraverso l'analisi in spettrometria di massa e validato, con tecnica immunohistochimica, alcuni potenziali marcatori tumorali coinvolti nel metabolismo del glucosio e nella regolazione del ciclo cellulare. Gli estratti proteici ottenuti da tessuti ghiandolari sani e da carcinomi semplici analizzati in spettrometria di massa hanno rivelato la presenza di 40 proteine differenzialmente espresse tra tessuto sano e neoplastico.

Tra queste, alcune molecole legate al binding dell'RNA, come le *ribonucleoproteine eterogenee nucleari* (Carpenter et al., 2006; Kim et al., 2009; Van Kouwenhove et al., 2011; Wurth, 2012) o altre regolatrici della trascrizione, come i vari membri della famiglia delle *heat shock protein*, sono state spesso associate all'iniziazione ed alla progressione tumorale (Silvera et al., 2010; Stumpf & Ruggero, 2011).

Risultato di non minore importanza è stato il riscontro di una sovraespressione nei tumori di proteine ed enzimi mitocondriali implicati nel metabolismo del glucosio. Questo dato appare in accordo con quanto riportato nel cancro al seno della donna ed in altre forme tumorali (Ralph et al., 2010; Gogvadze, 2011; He et al., 2011; Hu et al., 2011; Putignani et al., 2012), dove il potenziamento della via glicolitica e della via dei pentoso fosfati, al pari della conservazione delle attività mitocondriali, sono considerati eventi cruciali per la produzione di ATP, di ribosio e di potere riducente (NADH), elementi, questi, essenziali per la regolazione e il metabolismo delle neoplasie (Gatenby & Gillies, 2004; Wittig & Coy, 2008; Heiden et al., 2009; Cairns et al., 2011)

Alla luce di quanto sopra esposto, la seconda parte del nostro studio è stata dedicata alla valutazione immunoistochimica di tre proteine, Transchetolasi, Transchetolasi like 1 e Proibitina 2, risultate significativamente espresse nei tessuti mammari del cane, al fine di testare le loro potenzialità come marcatori nei CMT.

La transchetolasi è un enzima tiamina-difosfato dipendente (ThDP) appartenente alla famiglia delle transferasi e rappresenta il fattore limitante della conversione del glucosio a ribulosio nella *via dei pentoso fosfati* (Wittig & Coy, 2008; Cairns, et al., 2011). Considerando che l'85% del ribosio, necessario ai tumori per la biosintesi degli acidi nucleici viene prodotto attraverso la via *PPP*, questa proteina risulta essere indispensabile per la crescita cellulare in senso neoplastico (Boros et al., 1997).

In questo lavoro, l'espressione nucleare della TKT è stata osservata sia nei tessuti mammari sani, come precedentemente riportato da Coy (2005), che in tutte le lesioni alla mammella. Il riscontro di un' aumentata espressione proteica della TKT nelle lesioni iperplastiche e nei tumori benigni e maligni rispetto alla mammella sana indicherebbe un coinvolgimento significativo della via dei pentoso fosfati, strettamente legata alla via glicolitica, nel processo carcinogenetico dei CMT.

L' aumentata espressione della TKT riscontrata nei tumori mammari del cane appare sostanzialmente in accordo con quanto riportato in un recente lavoro effettuato in medicina umana, in cui è stato osservato un incremento dell'espressione immunohistochimica della TKT nei tessuti neoplastici rispetto al tessuto sano (Lin et al., 2011). Questo risultato, tuttavia, appare in contrasto con quanto descritto da Coy (2005), il quale riporta l' assenza di espressione differenziale dei livelli di mRNA di TKT tra le due tipologie di tessuto. In quest'ottica, le discordanze tra i risultati delle ricerche sopra citate potrebbero essere messe in relazione alla presenza di fenomeni di splicing alternativo dell'RNA o di modificazioni post-traduzionali in grado di modificare l'espressione proteica a livello tissutale (Vogel & Marcotte, 2012; Kocevcar et al., 2013).

A parziale conferma della validità dei nostri risultati e dell'importante ruolo giocato dalla TKT nell'iniziazione e nell'evoluzione del processo carcinogenetico, rimane il fatto che l'utilizzo di inibitori competitivi della transchetolasi in modelli sperimentali, come l'ossitamina, in grado di bloccare la fase non ossidativa della via dei pentoso fosfati, riducano sensibilmente la proliferazione cellulare neoplastica (Rais et al., 1999; Thomas et al., 2008; Lin et al., 2011; Wang et al., 2013).

Nella valutazione immunohistochimica, i carcinomi semplici hanno mostrato un'espressione inferiore della TKT rispetto alle altre classi di lesioni considerate, con

una riduzione significativa nelle forme maggiormente indifferenziate (grado III) rispetto a quelle di II grado. Il tendenziale decremento della proteina riscontrato all'aumentare del grado di malignità delle lesioni fa supporre, nel cane, l'esistenza di una ulteriore via molecolare in grado di limitare l'espressione della proteina nelle forme maggiormente aggressive. In tal senso, è dimostrato che la P53, spesso sovraespressa nei carcinomi semplici del cane (Lee et al., 2004; Terra et al., 2012), è in grado di inibire, attraverso numerosi meccanismi, la via dei pentoso fosfati e quindi anche l'espressione della transchetolasi (Shen et al., 2012; Berkers, et al., 2013).

Per quanto riguarda la proteina Transchetolasi like 1, isoforma della TKT, a probabile attività transchetolasica e spesso coinvolta nell'insorgenza di varie forme neoplastiche nell'uomo, è risultata, nel nostro lavoro, espressa nell'97% nelle lesioni iperplastiche e neoplastiche e nell'83% dei tessuti ghiandolari sani. L'analisi statistica dei dati di espressione proteica fra i differenti istotipi considerati ha mostrato un aumento della TKTL-1 nelle lesioni iperplastiche/displastiche e nelle forme neoplastiche semplici rispetto al tessuto ghiandolare sano, in accordo con quanto descritto nel cancro al seno della donna da Foldi (2007) e da Schultz (2008).

Tuttavia, a differenza di quanto riportato dai due autori, la TKTL-1 nei tessuti mammari del cane ha mostrato una riduzione dei valori d'immunoreattività all'aumentare del grado di malignità delle lesioni, con valori di *IRS* più elevati nelle lesioni iperplastiche/displastiche. Questo dato indica che la proteina gioca un ruolo cruciale nelle fasi iniziali dello sviluppo neoplastico dei CMT. Inoltre, la riduzione dei livelli di espressione della TKTL-1 nei carcinomi mammari semplici rispetto agli adenomi suggerisce l'utilizzo di questa proteina come valido marcatore tumorale nei CMT. In quest'ottica, si potrebbe ipotizzare che il blocco selettivo della TKTL-1 sia in grado di

limitare la progressione tumorale nelle sue fasi iniziali rappresentate dai fenomeni iperplastici e neoplastici benigni, trattando, quindi, questa patologia ai suoi esordi.

Le proibitine (PHB1 e PHB2) sono una famiglia di proteine prevalentemente localizzate a livello mitocondriale dove svolgono differenti funzioni in grado di regolare il ciclo cellulare, l'apoptosi, e di stabilizzare le subunità di nuova sintesi degli enzimi respiratori mitocondriali (Theiss & Sitaraman, 2011; Zhou & Qin, 2013). Il loro nome deriva da studi iniziali in cui veniva dimostrato il ruolo di queste proteine nel bloccare il ciclo cellulare attribuendogli la funzione di soppressori nella trasformazione neoplastica (Zhou & Qin, 2013).

Attualmente, tuttavia, diversi autori riportano una sovraespressione di queste proteine in differenti neoplasie dell'uomo, spesso associata a parametri prognostici indicativi di un comportamento biologico maligno e a tempi ridotti di sopravvivenza (Ren et al., 2010; Guo, et al., 2012; Cheng et al., 2013). Questo fa supporre un ruolo pro-tumorale sostanzialmente legato al potenziamento della via metabolica RAF-MEK-ERK coinvolta nella crescita cellulare e nella trasformazione maligna delle cellule (Rajalingam et al., 2005; Rajalingam & Rudel, 2005)

In questo lavoro la Proibitina-2 è risultata espressa in tutti i tessuti mammari esaminati, comprese le mammelle sane, vista la funzione di chaperon molecolare in grado di consentire la normale funzione mitocondriale. Questo dato è in linea con quanto descritto da Coates (2001), in cui viene dimostrata una fisiologica espressione della proteina in numerosi tessuti non neoplastici, dove la proteina gioca un ruolo sostanziale nel metabolismo e nell'integrità mitocondriale.

Tuttavia, la PHB2 è risultata maggiormente espressa nei tessuti neoplastici ed iperplastici mammari del cane confermando il ruolo pro-tumorale di questa proteina.

Considerando che l'unità funzionale in grado di esplicare l'attività biologica è costituita

dall'eterodimero PHB1/PHB2 (Merkwirth & Langer, 2009), questo dato appare sostanzialmente in accordo con quanto riportato nel cancro al seno della donna da Dell'Orco (1997) e da Najm (2013), dove viene riscontrata una sovraespressione delle PHB1 in associazione a parametri prognostici sfavorevoli.

La TKTL-1 e la PHB2 sono risultate maggiormente espresse nelle neoplasie mammarie semplici, sia benigne che maligne, rispetto alle forme complesse. Probabilmente, in quest'ottica, la diminuzione dell'espressione delle due proteine nelle forme complesse è relazionabile all'azione paracrina ed autocrina, descritta nel cancro al seno della donna, della componente mioepiteliale in grado di inibire la proliferazione in senso neoplastico delle cellule epiteliali (Sternlicht et al., 1997; Barsky & Karlin, 2005; Barsky & Karlin, 2006).

In sintesi, l'espressione delle proteine TKT, TKTL-1 e PHB2 è risultata differente tra mammella sana e neoplastica, indicando che il metabolismo del glucosio e l'integrità delle funzioni mitocondriali sono cruciali nel processo carcinogenetico dei tumori mammari dell'uomo e del cane. Secondo la definizione fornita da Atkinson (2010), un *marcatore tumorale* può essere definito come “una molecola biologica presente nel sangue, nei liquidi corporei o nei tessuti in grado di definire un processo come fisiologico oppure patologico e di valutare la risposta biologica ad un trattamento farmacologico”.

Da questo punto di vista, le tre proteine oggetto del nostro studio rivestono un ruolo di marcatori tumorali nei CMT essendo in grado di differenziare sostanzialmente un processo fisiologico da uno patologico. Tuttavia, sono necessari approfonditi studi clinici e dati di follow-up riguardanti un maggiore numero di animali per valutare la reale applicazione dei marcatori tumorali nella diagnosi, nella prognosi ed, eventualmente, nella terapia dei CMT.

6.5 Conclusioni

La Commissione Europea, nel documento denominato “*Strategia dell'Unione Europea per la protezione e il benessere degli animali 2012-2015*” cita la definizione di benessere animale della *World Organization for Animal Health (OIE)*, secondo la quale "un animale è in un buono stato di benessere se, come dimostrato da evidenze scientifiche, è sano, gode di condizioni confortevoli, è ben nutrito, sicuro, capace di esprimere comportamenti innati e non soffre stati spiacevoli come dolore, paura e stress”. Secondo questa definizione qualsiasi patologia che crei sofferenza e dolore è considerata capace di alterare lo stato di benessere dell’animale.

I tumori mammari sono considerati le forme neoplastiche più comunemente riscontrate nei cani e lo sviluppo di marcatori tumorali in grado di diagnosticare precocemente e di trattare efficacemente questa patologia appare essere l’unica strategia per limitare il dolore e le sofferenze degli animali. L’applicazione di tecnologie molecolari del tutto innovative in campo veterinario come la proteomica, ha consentito, in questo studio, di ridimensionare il ruolo attribuito sino ad oggi all’oncoproteina HER2 nei CMT e di evidenziare l’importanza di nuovi marcatori tumorali come la TKT, la TKTL-1 e la PHB2, peraltro mai investigati nel cane.

L’ulteriore sviluppo e l’applicazione su larga scala di queste tecniche consentirà di chiarire i complessi meccanismi molecolari che regolano lo sviluppo di una neoplasia, e di individuare dei marcatori tumorali da utilizzare nella pratica clinica per la diagnosi e la terapia dei CMT.

7. Bibliografia

- Ahern, T.E., Bird, R.C., Bird, A.E., Wolfe, L.G., 1996. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Am J Vet Res* 57, 693-696.
- Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K., Yamamoto, T., 1986. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 232, 1644-1646.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Keith, R., Walter, P. 2002a. Signaling through Enzyme-Linked Cell-Surface Receptors. In: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science, New York.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Keith, R., Walter, P. 2002b. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science, New York.
- Alenza, D.P., Rutteman, G.R., Pena, L., Beynen, A.C., Cuesta, P., 1998. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12, 132-139.
- Allen, S.W., Prasse, K.W., Mahaffey, E.A., 1986. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Vet Pathol* 23, 649-655.
- Andelfinger, G., Hitte, C., Etter, L., Guyon, R., Bourque, G., Tesler, G., Pevzner, P., Kirkness, E., Galibert, F., Benson, D.W., 2004. Detailed four-way comparative mapping and gene order analysis of the canine ctvm locus reveals evolutionary chromosome rearrangements. *Genomics* 83, 1053-1062.
- Andrade, F.H.E., Figueiroa, F.C., Bersano, P.R.O., Bissacot, D.Z., Rocha, N.S., 2010. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagnostic Pathology* 5.
- Antuofermo, E., Miller, M.A., Pirino, S., Xie, J., Badve, S., Mohammed, S.I., 2007. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - A model of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16, 2247-2256.
- Aroian, R.V., Koga, M., Mendel, J.E., Ohshima, Y., Sternberg, P.W., 1990. The let-23 gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily. *Nature* 348, 693-699.
- Atkinson, A.J., Colburn, W.A., De Gruttola, V.G., De Mets, D.L., Downing, G.J., Hoth, D.F., Oates, J.A., Peck, C.C., Schooley, R.T., Spilker, B.A., et al., 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 69, 89-95.
- Barbareschi, M., Pecciarini, L., Cangi, M.G., Macri, E., Rizzo, A., Viale, G., Doglioni, C., 2001. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *American Journal of Surgical Pathology* 25, 1054-1060.

- Barsky, S.H., Karlin, N.J., 2005. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10, 249-260.
- Barsky, S.H., Karlin, N.J., 2006. Mechanisms of disease: breast tumor pathogenesis and the role of the myoepithelial cell. *Nature Clinical Practice Oncology* 3, 138-151.
- Baselga, J., Swain, S.M., 2009. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature Reviews Cancer* 9, 463-475.
- Bazley, L.A., Gullick, W.J., 2005. The epidermal growth factor receptor family. *Endocrine-Related Cancer* 12, S17-S27.
- Beauvais, W., Cardwell, J.M., Brodbelt, D.C., 2012. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs - a systematic review. *Journal of Small Animal Practice* 53, 314-322.
- Beha, G., Brunetti, B., Asproni, P., Muscatello, L.V., Millanta, F., Poli, A., Sarli, G., Benazzi, C., 2012. Molecular portrait-based correlation between primary canine mammary tumor and its lymph node metastasis: possible prognostic-predictive models and/or stronghold for specific treatments? *Bmc Veterinary Research* 8.
- Berkers, C.R., Maddocks, O.D., Cheung, E.C., Mor, I., Vousden, K.H., 2013. Metabolic Regulation by p53 Family Members. *Cell Metabolism* 18, 617-633.
- Bertagnolli, A.C., Cassali, G.D., Genelhu, M.C., Costa, F.A., Oliveira, J.F., Goncalves, P.B., 2009. Immunohistochemical expression of p63 and deltaNp63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. *Vet Pathol* 46, 407-415.
- Bishop, J.M., 1991. Molecular Themes in Oncogenesis. *Cell* 64, 235-248.
- Blume-Jensen, P., Hunter, T., 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365.
- Bocker, W., Moll, R., Poremba, C., Holland, R., van Diest, P.J., Dervan, P., Burger, H., Wai, D., Diallo, R.I., Brandt, B., et al., 2002. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: A new cell biological concept. *Laboratory Investigation* 82, 737-745.
- Boros, L.G., Puigjaner, J., Cascante, M., Lee, W.N., Brandes, J.L., Bassilian, S., Yusuf, F.I., Williams, R.D., Muscarella, P., Melvin, W.S., et al., 1997. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Research* 57, 4242-4248.
- Brambell Committee. 1965. Report of the technical committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems. Command Paper 2836. Her Majesty's Stationery Office, London.
- Bundgaard-Andersen, K., Flagstad, A., Jensen, A.L., Hellmen, E., Trere, D., 2008. Correlation between the histopathological diagnosis by AgNOR count and AgNOR area in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 1174-1180.

- Buyse, M., Sargent, D.J., Grothey, A., Matheson, A., De Gramont, A., 2010. Biomarkers and surrogate end points—the challenge of statistical validation. *Nature Reviews Clinical Oncology* 7, 309-317.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W., 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* 11, 85-95.
- Carenzi, C., Verga, M., 2009. Animal welfare: review of the scientific concept and definition. *Italian Journal of Animal Science* 8, 21-30.
- Carpenter, B., MacKay, C., Alnabulsi, A., MacKay, M., Telfer, C., Melvin, W.T., Murray, G.I., 2006. The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1765, 85-100.
- Cassali, G.D., Gobbi, H., Malm, C., Schmitt, F.C., 2007. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology* 18, 191-196.
- Ceciliani, F., Eckersall, D., Burchmore, R., Lecchi, C., 2013. Proteomics in Veterinary Medicine: Applications and Trends in Disease Pathogenesis and Diagnostics. *Vet Pathol*.
- Chang, C.C., Tsai, M.H., Liao, J.W., Chan, J.P.W., Wong, M.L., Chang, S.C., 2009. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association* 235, 391-396.
- Chatterjee, S.K., Zetter, B.R., 2005. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncology* 1, 37-50.
- Chen, H., Yue, J.X., Yang, S.H., Ding, H., Zhao, R.W., Zhang, S., 2009. Overexpression of transketolase-like gene 1 is associated with cell proliferation in uterine cervix cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 28.
- Cheng, J., Gao, F., Chen, X., Wu, J., Xing, C., Lv, Z., Xu, W., Xie, Q., Wu, L., Ye, S., Xie, H., Zheng, S., Zhou, L., 2013. Prohibitin-2 promotes hepatocellular carcinoma malignancy progression in hypoxia based on a label-free quantitative proteomics strategy. *Mol Carcinog*.
- Chial, H. 2008. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education* 1
- Chin, L., Gray, J.W., 2008. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature* 452, 553-563.
- Cho, W.C.S., 2007. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Molecular Cancer* 6.
- Cho, W.C.S., Cheng, C.H.K., 2007. Oncoproteomics: current trends and future perspectives. *Expert Review of Proteomics* 4, 401-410.
- Cleary, M.P., Grossmann, M.E., Ray, A., 2010. Effect of Obesity on Breast Cancer Development. *Veterinary Pathology* 47, 202-213.

- Coates, P.J., Nenutil, R., McGregor, A., Picksley, S.M., Crouch, D.H., Hall, P.A., Wright, E.G., 2001. Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence. *Experimental Cell Research* 265, 262-273.
- Cottrell, J.S., 1994. Protein Identification by Peptide Mass Fingerprinting. *Peptide Research* 7, 115
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., et al., 1985. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230, 1132-1139.
- Cowell, J.K., 1982. Double minutes and homogeneously staining regions: gene amplification in mammalian cells. *Annual Review of Genetics* 16, 21-59.
- Coy, J.F., Dubel, S., Kioschis, P., Thomas, K., Micklem, G., Delius, H., Poustka, A., 1996. Molecular cloning of tissue-specific transcripts of a transketolase-related gene: Implications for the evolution of new vertebrate genes. *Genomics* 32, 309-316.
- Coy, J.F., Dressler, D., Wilde, J., Schubert, P., 2005. Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: Clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clinical Laboratory* 51, 257-273.
- Cully, M., You, H., Levine, A.J., Mak, T.W., 2006. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 6, 184-192.
- De La Haba, G., Leder, I.G., Racker, E., 1955. Crystalline transketolase from bakers' yeast: isolation and properties. *Journal of Biological Chemistry* 214, 409-426.
- De Las Mulas, J., Ordas, J., Millan, Y., Fernandez-Soria, V., Ramon y Cajal, S., 2003. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat* 80, 363-367.
- De Las Mulas, J.M., Millan, Y., Dios, R., 2005. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology* 42, 200-212.
- De Lorimier, L.P., Fan, T.M., 2005. Understanding and recognizing cancer pain in dogs and cats. *Veterinary Medicine* 100, 352-+.
- De Matos, A.J., Lopes, C.C., Faustino, A.M., Carvalheira, J.G., Rutteman, G.R., Gartner Mde, F., 2007. E-cadherin, b-catenin, invasion and lymph node metastases in canine malignant mammary tumours. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 115, 327-334.
- Dell'Orco, R.T., Jupe, E.R., Manjeshwar, S., Liu, X.T., McClung, J.K., King, R., Hollingsworth, A., Lightfoot, S. Kern, W , 1997. Prohibitin: a new biomarker for breast tumors. *Breast Journal* 3, 85-89.

- Demaria, S., Pikarsky, E., Karin, M., Coussens, L.M., Chen, Y.C., El-Omar, E.M., Trinchieri, G., Dubinett, S.M., Mao, J.T., Szabo, E. et al., 2010. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *Journal of Immunotherapy* 33, 335-351.
- Den Hollander, P., Savage, M.I., Brown, P.H., 2013. Targeted Therapy for Breast Cancer Prevention. *Front Oncol* 3, 250.
- Dewhirst, M.W., Secomb, T.W., Ong, E.T., Hsu, R., Gross, J.F., 1994. Determination of local oxygen consumption rates in tumors. *Cancer Research* 54, 3333-3336.
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, J.L.N., 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice* 43, 240-246.
- Doherty, M.K., Beynon, R.J., Whitfield, P.D., 2008. Proteomics and naturally occurring animal diseases: Opportunities for animal and human medicine. *Proteomics Clin Appl* 2, 135-141.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., Waterfield, M.D., 1984. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521-527.
- Dutra, A.P., Granja, N.V., Schmitt, F.C., Cassali, G.D., 2004. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res* 37, 1673-1681.
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., von Euler, H., 2005. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine* 69, 109-127.
- Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Sastre-Garau, X., 2003. Tumours of the breast. In: Tavassoli, F.A., Devilee, P., (Eds.), *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press; Lyon, France.
- Ellis, I.O., 2010. Intraductal proliferative lesions of the breast: morphology, associated risk and molecular biology. *Modern Pathology* 23, S1-S7.
- El-Rehim, D.M.A., Pinder, S.E., Paish, C.E., Bell, J., Blamey, R., Robertson, J.F.R., Nicholson, R.I., Ellis, I.O., 2004. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *Journal of Pathology* 203, 661-671.
- Espinosa Los de Monteros, A., Millan, M.Y., Ordas, J., Carrasco, L., Reymundo, C., de Las Mulas, J., 2002. Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. *Vet Pathol* 39, 247-256.
- Etschmann, B., Wilcken, B., Stoevesand, K., von der Schulenburg, A., Sterner-Kock, A., 2006. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in

- canine mammary tumors using the GeNorm algorithm. *Veterinary Pathology* 43, 934-942.
- Falini, B., Mason, D.Y., 2002. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 99, 409-426.
- Ferreira, E., Gobbi, H., Saraiva, B.S., Cassali, G.D., 2010. Columnar cell lesions of the canine mammary gland: pathological features and immunophenotypic analysis. *BMC Cancer* 10.
- Fischer, M., Skowron, M., Berthold, F., 2005. Reliable transcript quantification by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in primary neuroblastoma using normalization to averaged expression levels of the control genes HPRT1 and SDHA. *Journal of Molecular Diagnostics* 7, 89-96.
- Foidart, J.M., Colin, C., Denoo, X., Desreux, J., Beliard, A., Fournier, S., de Lignieres, B., 1998. Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells. *Fertility and Sterility* 69, 963-969.
- Foldi, M., Stickeler, E., Bau, L., Kretz, O., Watermann, D., Gitsch, G., Kayser, G., zur Hausen, A., Coy, J.F., 2007. Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer. *Oncology Reports* 17, 841-845.
- Fritz, P., Coy, J.F., Murdter, T.E., Ott, G., Alscher, M.D., Friedel, G., 2012. TKTL-1 expression in lung cancer. *Pathology Research and Practice* 208, 203-209.
- Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, S., Joshi, B., Chellappan, S., 2003. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47853-47861.
- Gama, A., Alves, A., Gartner, F., Schmitt, F., 2003. p63: A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Veterinary Pathology* 40, 412-420.
- Gama, A., Paredes, J., Albergaria, A., Gartner, R., Schmitt, F., 2004. P-cadherin expression in canine mammary tissues. *Journal of Comparative Pathology* 130, 13-20.
- Gama, A., Alves, A., Schmitt, F., 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv* 453, 123-132.
- Gama, A., Schmitt, F., 2012. Cadherin cell adhesion system in canine mammary cancer: a review. *Vet Med Int* 2012, 357187.
- Gambhir, S.S., 2002. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nature Reviews Cancer* 2, 683-693.
- Gatenby, R.A., Gillies, R.J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* 4, 891-899.

- Gobello C., 2001. Canine pseudopregnancy: a review. International Veterinary Information Service.
- Godovac-Zimmermann, J., Brown, L.R., 2001. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrometry Reviews* 20, 1-57.
- Gogvadze, V., 2011. Targeting Mitochondria in Fighting Cancer. *Current Pharmaceutical Design* 17, 4034-4046.
- Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R., Zappulli, V., 2011. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* 48, 117-131.
- Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W., Giaccia, A.J., 1996. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, 88-91.
- Griffey, S.M., Madewell, B.R., Dairkee, S.H., Hunt, J.E., Naydan, D.K., Higgins, R.J., 1993. Immunohistochemical Reactivity of Basal and Luminal Epithelium-Specific Cytokeratin Antibodies within Normal and Neoplastic Canine Mammary-Glands. *Veterinary Pathology* 30, 155-161.
- Griffiths, G.L., Lumsden, J.H., Valli, V.E., 1984. Fine needle aspiration cytology and histologic correlation in canine tumors. *Vet Clin Pathol* 13, 13-17.
- Gschwind, A., Fischer, O.M., Ullrich, A., 2004. Timeline - The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 4, 361-370.
- Guimaraes, M.J., Carvalho, M.I., Pires, I., Prada, J., Gil, A.G., Lopes, C., Queiroga, F.L., 2013. Concurrent Expression of Cyclo-oxygenase-2 and Epidermal Growth Factor Receptor in Canine Malignant Mammary Tumours. *Journal of Comparative Pathology*.
- Gumbiner, B.M., 1996. Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.
- Guo, F., Hiroshima, K., Wu, D., Satoh, M., Abulazi, M., Yoshino, I., Tomonaga, T., Nomura, F., Nakatani, Y., 2012. Prohibitin in squamous cell carcinoma of the lung: its expression and possible clinical significance. *Human Pathology* 43, 1282-1288.
- Guo, T., Lee, C.S., Wang, W., DeVoe, D.L., Balgley, B.M., 2006. Capillary separations enabling tissue proteomics-based biomarker discovery. *Electrophoresis* 27, 3523-3532
- Hampe, J.F., Misdorp, W., 1974. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World Health Organ* 50, 111-133.
- Hanash, S., 2011. Progress in Mining the Human Proteome for Disease Applications. *Omics-a Journal of Integrative Biology* 15, 133-139.
- Hartmann, L.C., Sellers, T.A., Frost, M.H., Lingle, W.L., Degen, A.C., Ghosh, K., Vierkant, R.A., Maloney, S.D., Pankratz, V.S., Hillman, D.W., et al., 2005. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine* 353, 229-237.

- He, J., Whelan, S.A., Lu, M., Shen, D., Chung, D.U., Saxton, R.E., Faull, K.F., Whitelegge, J.P., Chang, H.R., 2011. Proteomic-based biosignatures in breast cancer classification and prediction of therapeutic response. *Int J Proteomics* 2011, 896476.
- Hedlund, C.S., 2002. Mammary neoplasia. In: Fossum, T.W. (Ed), *Small animal surgery*, 2nd ed. Mosby, St. Louis.
- Heerema, N.A., 1998. Molecular genetics, part 5 - Chromosomes in lymphomas and solid tumors. *Cancer Investigation* 16, 183-187.
- Heiden, M.G.V., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324, 1029-1033.
- Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., Jain, R.K., 1997. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Medicine* 3, 177-182.
- HerceptTest™, Interpretation Manual - Breast: <http://www.dako.com/it/index/>
- Hsu, W.L., Huang, H.M., Liao, J.W., Wong, M.L., Chang, S.C., 2009. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Vet J* 180, 116-123.
- Hu, H., Deng, C., Yang, T., Dong, Q., Chen, Y., Nice, E.C., Huang, C.H., Wei, Y.Q., 2011. Proteomics revisits the cancer metabolome. *Expert Review of Proteomics* 8, 505-533.
- Hudis, C.A., 2007. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 357, 39-51.
- Hynes, N.E., Lane, H.A., 2005. ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 5.
- Kaaks, R., Berrino, F., Key, T., Rinaldi, S., Dossus, L., Biessy, C., Secreto, G., Amiano, P., Bingham, S., Boeing, H., et al., 2005. Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Journal of the National Cancer Institute* 97, 755-765.
- Kaelin, W.G., 1999. The emerging p53 gene family. *Journal of the National Cancer Institute* 91, 594-598.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., Dessiris, A., 2005. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology* 133, 246-252.
- Kasashima, K., Ohta, E., Kagawa, Y., Endo, H., 2006. Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2. *Journal of Biological Chemistry* 281, 36401-36410.

- Kilpinen, H., Dermitzakis, E.T., 2012. Genetic and epigenetic contribution to complex traits. *Human Molecular Genetics* 21, R24-R28.
- Kim, J.H., Im, K.S., Kim, N.H., Yhee, J.Y., Nho, W.G., Sur, J.H., 2011. Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: histopathological and immunohistochemical study. *Vet J* 189, 318-322.
- Kim, M.Y., Hur, J., Jeong, S., 2009. Emerging roles of RNA and RNA-binding protein network in cancer cells. *Bmb Reports* 42, 125-130.
- Klopfleisch, R., Klose, P., Gruber, A.D., 2010. The combined expression pattern of BMP2, LTBP4, and DERL1 discriminates malignant from benign canine mammary tumors. *Vet Pathol* 47, 446-454.
- Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S.S., Gartner, F., Gruber, A.D., 2011. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Vet Pathol* 48, 98-116.
- Klopfleisch, R., Gruber, A.D., 2012. Transcriptome and Proteome Research in Veterinary Science: What Is Possible and What Questions Can Be Asked? *Scientific World Journal*
- Knudsen, K.A., Frankowski, C., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., 1998. A role for cadherins in cellular signaling and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 168-176.
- Kocevar, N., Hudler, P., Komel, R., 2013. The progress of proteomic approaches in searching for cancer biomarkers. *N Biotechnol* 30, 319-326.
- Kochetov, G.A., 1986. Transketolase: structure and mechanism of action. *Biokhimiia* 51, 2010-2029.
- Koster, M.I., Kim, S., Mills, A.A., DeMayo, F.J., Roop, D.R., 2004. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes & Development* 18, 126-131.
- Krockenberger, M., Honig, A., Rieger, L., Coy, J.F., Sutterlin, M., Kapp, M., Horn, E., Dietl, J., Kammerer, U., 2007. Transketolase-like 1 expression correlates with subtypes of ovarian cancer and the presence of distant metastases. *International Journal of Gynecological Cancer* 17, 101-106.
- Krogh, A., 1919. The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J Physiol* 52, 409-415.
- Kulasingam, V., Diamandis, E.P., 2008. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clinical Practice Oncology* 5, 588-599.
- Kumar, S., Mohan, A., Guleria, R., 2006. Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review. *Biomarkers* 11, 385-405.

- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., 2005. Neoplasia. In: Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. (Eds.), Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA
- Lana, S.E., Rutteman, G.R., Withrow, S.J., 2007. Tumors of the mammary gland. In: Withrow, S.J., MacEwen, E.G. (Eds.), Small Animal Clinical Oncology, 4th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA. pp 619-636.
- Langbein, S., Zerilli, M., zur Hausen, A., Staiger, W., Rensch-Boschert, K., Lukan, N., Popa, J., Ternullo, M.P., Steidler, A., Weiss, C., et al., 2006. Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *British Journal of Cancer* 94, 578-585.
- Lee, C.H., Kim, W.H., Lim, J.H., Kang, M.S., Kim, D.Y., Kweon, O.K., 2004. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science* 5, 63-69.
- Lin, C.C., Chen, L.C., Tseng, V.S., Yan, J.J., Lai, W.W., Su, W.P., Lin, C.H., Huang, C.Y.F., Su, W.C., 2011. Malignant pleural effusion cells show aberrant glucose metabolism gene expression. *European Respiratory Journal* 37, 1453-1465.
- Ling, M.M., Ricks, C., Lea, P., 2007. Multiplexing molecular diagnostics and immunoassays using emerging microarray technologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 7, 87-98.
- Little, N.A., Jochemsen, A.G., 2002. p63. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 6-9.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25, 402-408.
- Livneh, E., Glazer, L., Segal, D., Schlessinger, J., Shilo, B.Z., 1985. The Drosophila Egf Receptor Gene Homolog - Conservation of Both Hormone Binding and Kinase Domains. *Cell* 40, 599-607.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J., 2000a. Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. In: Freeman, W.H. (Ed), *Molecular Cell Biology*, 4th ed. New York.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J., 2000b. Receptor Tyrosine Kinases and Ras. In: Freeman, W.H. (Ed), *Molecular Cell Biology*, 4th ed. New York
- Lopez-Garcia, M.A., Geyer, F.C., Lacroix-Triki, M., Marchio, C., Reis, J.S., 2010. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology* 57, 171-192.
- Ludwig, J.A., Weinstein, J.N., 2005. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Reviews Cancer* 5, 845-856.
- Majewski, I.J., Bernards, R., 2011. Taming the dragon: genomic biomarkers to individualize the treatment of cancer. *Nature Medicine* 17, 304-312.

- Massion, P.P., Taflan, P.M., Rahman, S.M.J., Yildiz, P., Shyr, Y., Edgerton, M.E., Westfall, M.D., Roberts, J.R., Pietenpol, J.A., Carbone, D.P., et al., 2003. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Research* 63, 7113-7121.
- Matsuyama, S., Nakamura, M., Yonezawa, K., Shimada, T., Ohashi, F., Takamori, Y., Kubo, K., 2001. Expression patterns of the erbB subfamily mRNA in canine benign and malignant mammary tumors. *J Vet Med Sci* 63, 949-954.
- Mengwasser, J., Piau, A., Schlag, P., Sleeman, J.P., 2004. Differential immunization identifies PHB1/PHB2 as blood-borne tumor antigens. *Oncogene* 23, 7430-7435.
- Merkwirth, C., Dargazanli, S., Tatsuta, T., Geimer, S., Lower, B., Wunderlich, F.T., von Kleist-Retzow, J.C., Waisman, A., Westermann, B., Langer, T., 2008. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes & Development* 22, 476-488.
- Merkwirth, C., Langer, T., 2009. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1793, 27-32.
- Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., Ratto, A., Sambucco, P.L., Sestito, V., Tanara, G., et al., 2008. Cancer incidence in pet dogs: Findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 976-984.
- Meshalkina, L.E., Druitsa, V.L., Koroleva, O.N., Solovjeva, O.N., Kochetov, G.A., 2013. Is transketolase-like protein, TKTL1, transketolase? *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1832, 387-390.
- Miettinen, P.J., Berger, J.E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R.A., Werb, Z., Derynck, R., 1995. Epithelial Immaturity and Multiorgan Failure in Mice Lacking Epidermal Growth-Factor Receptor. *Nature* 376, 337-341.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I., Poli, A., 2005. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science* 79, 225-232.
- Misdorp, W., Else W., Hellmen, E., Lipscomb T.P., 1999. Histological classification of the mammary tumours of the dog and the cat. In: Schulman, F.Y. (Ed.). *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of the Domestic Animals, 2nd Series, Vol. 7*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, USA.
- Misdorp, W., 2002. Tumors of the Mammary Gland. In: Meuten, D.J. (Ed), *Tumors in Domestic Animals, 4th ed*. Iowa State Press, Ames, Iowa. pp 575-606.
- Mishra, A and Verma M, 2010. Cancer Biomarkers: Are We Ready for the Prime Time? *Cancers* 2(1), 190-208.
- Mishra, S., Murphy, L.C., Murphy, L.J., 2006. The prohibitins: emerging roles in diverse functions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10, 353-363.

- Mitschke, L., Parthier, C., Schroder-Tittmann, K., Coy, J., Ludtke, S., Tittmann, K., 2010. The Crystal Structure of Human Transketolase and New Insights into Its Mode of Action. *Journal of Biological Chemistry* 285, 31559-31570.
- Mohammed, S.I., Meloni, G.B., Parpaglia, M.L.P., Marras, V., Burrari, G.P., Meloni, F., Pirino, S., Antuofermo, E., 2011. Mammography and Ultrasound Imaging of Preinvasive and Invasive Canine Spontaneous Mammary Cancer and Their Similarities to Human Breast Cancer. *Cancer Prevention Research* 4, 1790-1798.
- Mol, J.A., vanGarderen, E., Rutteman, G.R., Rijnberk, A., 1996. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: Induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 57, 67-71.
- Moll, R., Divo, M., Langbein, L., 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology* 129, 705-733.
- Montano, M.M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W.R., Martini, P., Katzenellenbogen, B.S., 1999. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6947-6952.
- Montcourrier, P., Silver, I., Farnoud, R., Bird, I., Rochefort, H., 1997. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clinical & Experimental Metastasis* 15, 382-392.
- Mouser, P., Miller, M.A., Antuofermo, E., Badve, S.S., Mohammed, S.I., 2010. Prevalence and Classification of Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs Without Clinical Mammary Disease. *Veterinary Pathology* 47, 275-284.
- Muhammadnejad, A., Keyhani, E., Mortazavi, P., Behjati, F., Haghdoost, I.S., 2012. Overexpression of her-2/neu in malignant mammary tumors; translation of clinicopathological features from dog to human. *Asian Pac J Cancer Prev* 13, 6415-6421
- Munoz-Pinedo, C., Ruiz-Ruiz, C., de Almodovar, C.R., Palacios, C., Lopez-Rivas, A., 2003. Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing. *Journal of Biological Chemistry* 278, 12759-12768.
- Murua Escobar, H., Becker, K., Bullerdiek, J., Nolte, I., 2001. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytogenetics and Cell Genetics* 94, 194-195.
- Najm, M.Z., Zaidi, S., Siddiqui, W.A., Husain, S.A., 2013. Immunohistochemical expression and mutation study of Prohibitin gene in Indian female breast cancer cases. *Medical Oncology* 30, 614.

- Nieto, A., Pena, L., Perez-Alenza, M.D., Sanchez, M.A., Flores, J.M., Castano, M., 2000. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: Clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Veterinary Pathology* 37, 239-247.
- Nijtmans, L.G.J., Sanz, M.A., Grivell, L.A., Coates, P.J., 2002. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 143-155.
- Nistor, A., Watson, P.H., Pettigrew, N., Tabiti, K., Dawson, A., Myal, Y., 2006. Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer. *BMC Clin Pathol* 6, 2.
- Nuell, M.J., Stewart, D.A., Walker, L., Friedman, V., Wood, C.M., Owens, G.A., Smith, J.R., Schneider, E.L., Dell'Orco, R., Lumpkin, C.K., et al., 1991. Prohibitin, an Evolutionarily Conserved Intracellular Protein That Blocks DNA-Synthesis in Normal Fibroblasts and Hela-Cells. *Molecular and Cellular Biology* 11, 1372-1381.
- Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A., Obinata, M., Ikawa, S., 1998. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nature Medicine* 4, 839-843.
- Otoni, C.C., Rahal, S.C., Vulcano, L.C., Ribeiro, S.M., Hette, K., Giordano, T., Doiche, D.P., Amorim, R.L., 2010. Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. *Acta Veterinaria Scandinavica* 52.
- Owens LN, 1980. Classification of tumors in domestic animals, 1st edition. Geneva: World Health Organization.
- Pappin, D.J.C., Hojrup, P., Bleasby, A.J., 1993. Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting. *Current Biology* 3, 327-332.
- Paredes, J., Milanezi, F., Reis, J.S., Leitao, D., Athanazio, D., Schmitt, F., 2002. Aberrant P-cadherin expression: Is it associated with estrogen-independent growth in breast cancer? *Pathology Research and Practice* 198, 795-801.
- Paredes, J., Correia, A.L., Ribeiro, A.S., Albergaria, A., Milanezi, F., Schmitt, F.C., 2007. P-cadherin expression in breast cancer: a review. *Breast Cancer Research* 9.
- Park, H.J., Lyons, J.C., Ohtsubo, T., Song, C.W., 1999. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *British Journal of Cancer* 80, 1892-1897.
- Park, J.W., Neve, R.A., Szollosi, J., Benz, C.C., 2008. Unraveling the Biologic and Clinical Complexities of HER2. *Clinical Breast Cancer* 8, 392-401.
- Payne, S.J.L., Bowen, R.L., Jones, J.L., Wells, C.A., 2008. Predictive markers in breast cancer - the present. *Histopathology* 52, 82-90.

- Philibert, J.C., Snyder, P.W., Glickman, N., Glickman, L.T., Knapp, D.W., Waters, D.J., 2003. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17, 102-106.
- Pierotti, M.A., Sozzi, G., Croce, C.M., 2003a. Discovery and identification of oncogenes. In: Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R. (Eds.), *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th ed. Hamilton (ON), BC Decker.
- Pierotti, M.A., Sozzi, G., Croce, C.M., 2003b. Mechanisms of oncogene activation. In: Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R. (Eds.), *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th ed. Hamilton (ON), BC Decker.
- Putignani, L., Raffa, S., Pescosolido, R., Rizza, T., Del Chierico, F., Leone, L., Aimati, L., Signore, F., Carrozzo, R., Callea, F., Torrisi, M.R., Grammatico, P., 2012. Preliminary evidences on mitochondrial injury and impaired oxidative metabolism in breast cancer. *Mitochondrion* 12, 363-369.
- Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C., Illera, J.C., 2005. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94, 181-187.
- Queiroga, F.L., Alves, A., Pires, I., Lopes, C., 2007. Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 136, 177-185.
- Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C.S., Illera, J.C., 2008. Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 beta-estradiol) in canine mammary tumours. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 110, 76-82.
- Queiroga, F.L., Pires, I., Lobo, L., Lopes, C.S., 2010. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 88, 441-445.
- Rais, B., Comin, B., Puigjaner, J., Brandes, J.L., Creppy, E., Saboureau, D., Ennamany, R., Lee, W.N., Boros, L.G., Cascante, M., 1999. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *Febs Letters* 456, 113-118.
- Rajalingam, K., Rudel, T., 2005. Ras-Raf signaling needs prohibitin. *Cell Cycle* 4, 1503-1505.
- Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C., Rapp, U.R., Rudel, T., 2005. Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nature Cell Biology* 7, 837-843.
- Ralph, S.J., Rodriguez-Enriquez, S., Neuzil, J., Saavedra, E., Moreno-Sanchez, R., 2010. The causes of cancer revisited: "Mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - Why mitochondria are targets for cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine* 31, 145-170.
- Ramalho, L.N.Z., Ribeiro-Silva, A., Cassali, G.D., Zucoloto, S., 2006. The expression of p63 and cytokeratin 5 in mixed tumors of the canine mammary gland provides

- new insights into the histogenesis of these neoplasms. *Veterinary Pathology* 43, 424-429.
- Ramos-Montoya, A., Lee, W.N., Bassilian, S., Lim, S., Trebukhina, R.V., Kazhyna, M.V., Ciudad, C.J., Noe, V., Centelles, J.J., Cascante, M., 2006. Pentose phosphate cycle oxidative and nonoxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *International Journal of Cancer* 119, 2733-2741.
- Reis, J.S., Lakhani, S.R., 2003. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease - Genetic alterations in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Research* 5, 313-319.
- Ren, H.Z., Wang, J.S., Wang, P., Pan, G.Q., Wen, J.F., Fu, H., Shan, X.Z., 2010. Increased expression of prohibitin and its relationship with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Pathology & Oncology Research* 16, 515-522.
- Ressel, L., Puleio, R., Loria, G.R., Vannozzi, I., Millanta, F., Caracappa, S., Poli, A., 2013. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Res Vet Sci* 94, 299-305.
- Ross, J.S., Slodkowska, E.A., Symmans, W.F., Pusztai, L., Ravdin, P.M., Hortobagyi, G.N., 2009. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 14, 320-368.
- Rozhin, J., Sameni, M., Ziegler, G., Sloane, B.F., 1994. Pericellular Ph Affects Distribution and Secretion of Cathepsin-B in Malignant-Cells. *Cancer Research* 54, 6517-6525.
- Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K., Miyoshi, N., Hayashi, T., 1999. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Medical Science* 61, 27-32.
- Rutteman, G.R., 1990. Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In Vivo* 4, 33-40.
- Ryu, J.W., Kim, H.J., Lee, Y.S., Myong, N.H., Hwang, C.H., Lee, G.S., Yom, H.C., 2003. The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer. *Journal of Korean Medical Science* 18, 505-509.
- Sanz, M.A., Tsang, W.Y., Willems, E.M., Grivell, L.A., Lemire, B.D., van der Spek, H., Nijtmans, L.G.J., 2003. The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 32091-32099.
- Sartin, E.A., Barnes, S., Toiviokinnucan, M., Wright, J.C., Wolfe, L.G., 1993. Heterogenic Properties of Clonal Cell-Lines Derived from Canine Mammary Carcinomas and Sensitivity to Tamoxifen and Doxorubicin. *Anticancer Research* 13, 229-236.

- Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sarli, G., 2010. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *Bmc Veterinary Research* 6.
- Schechter, A.L., Hung, M.C., Vaidyanathan, L., Weinberg, R.A., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Ullrich, A., Coussens, L., 1985. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 229, 976-978.
- Schenk, G., Duggleby, R.G., Nixon, P.F., 1998. Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30, 1297-1318.
- Schmidt, M., Voelker, H.U., Kapp, M., Krockenberger, M., Dietl, J., Kammerer, U., 2010. Glycolytic phenotype in breast cancer: activation of Akt, up-regulation of GLUT1, TKTL1 and down-regulation of M2PK. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 136, 219-225.
- Schneider, R., Dorn, C.R., Taylor, D.O., 1969. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst* 43, 1249-1261.
- Schneider, S., Ludtke, S., Schroder-Tittmann, K., Wechsler, C., Meyer, D., Tittmann, K., 2012. A Delta 38 deletion variant of human Transketolase as a model of Transketolase-Like Protein 1 Exhibits No Enzymatic Activity. *Plos One* 7.
- Schorken, U., Sprenger, G.A., 1998. Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1385, 229-243.
- Schrohl, A.S., Pedersen, H.C., Jensen, S.S., Nielsen, S.L., Brunner, N., 2011. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) immunoreactivity: specificity of three pharmacodiagnostic antibodies. *Histopathology* 59, 975-983.
- Schultz, H., Kahler, D., Branscheid, D., Vollmer, E., Zabel, P., Goldmann, T., 2008. TKTL1 is overexpressed in a large portion of non-small cell lung cancer specimens. *Diagnostic Pathology* 3.
- Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A.D., Rogers, M.A., et al., 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *Journal of Cell Biology* 174, 169-174.
- Shafiee, R., Javanbakht, J., Atyabi, N., Kheradmand, P., Kheradmand, D., Bahrani, A., Daraei, H., Khadivar, F., 2013. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohstopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell International* 13.
- Shen, L., Sun, X., Fu, Z.H., Yang, G.D., Li, J.Y., Yao, L.B., 2012. The Fundamental Role of the p53 pathway in tumor metabolism and its implication in tumor therapy. *Clinical Cancer Research* 18, 1561-1567.

- Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M., Weinberg, R.A., 1981. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290, 261-264.
- Shilo, B.Z., 2003. Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Experimental Cell Research* 284, 140-149.
- Shofer, F.S., Sonnenschein, E.G., Goldschmidt, M.H., Laster, L.L., Glickman, L.T., 1989. Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary-carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment* 13, 49-60.
- Sibilia, M., Wagner, E.F., 1995. Strain-Dependent epithelial defects in mice lacking the Egf Receptor (Vol 269, Pg 234, 1995). *Science* 269, 909-909.
- Sibilia, M., Kroismayr, R., Lichtenberger, B.M., Natarajan, A., Hecking, M., Holcman, M., 2007. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 75, 770-787.
- Sievers, C., Billig, G., Gottschalk, K., Rudel, T., 2010. Prohibitins are required for cancer cell proliferation and adhesion. *Plos One* 5, e12735.
- Silvera, D., Formenti, S.C., Schneider, R.J., 2010. Translational control in cancer. *Nature Reviews Cancer* 10, 254-266.
- Simeonov, R., Simeonova, G., 2006. Computerized morphometry of mean nuclear diameter and nuclear roundness in canine mammary gland tumors on cytologic smears. *Vet Clin Pathol* 35, 88-90.
- Simon, D., Schoenrock, D., Nolte, I., Baumgartner, W., Barron, R., Mischke, R., 2009. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Vet Clin Pathol* 38, 521-528.
- Singer, J., Weichselbaumer, M., Stockner, T., Mechtcheriakova, D., Sobanov, Y., Bajna, E., Wrba, F., Horvat, R., Thalhammer, J.G., Willmann, M., et al., 2012. Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. *Molecular Immunology* 50, 200-209.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L., 1987. Human-Breast Cancer - correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2 Neu Oncogene. *Science* 235, 177-182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al., 1989. Studies of the Her-2/Neu Proto-Oncogene in human-breast and ovarian-cancer. *Science* 244, 707-712.
- Sleeckx, N., de Rooster, H., Kroeze, E.J.B.V., Van Ginneken, C., Van Brantegem, L., 2011. Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reproduction in Domestic Animals* 46, 1112-1131.

- Sonnenschein, E.G., Glickman, L.T., Goldschmidt, M.H., Mckee, L.J., 1991. Body conformation, diet, and risk of breast-cancer in pet dogs - a case-control study. *American Journal of Epidemiology* 133, 694-703.
- Sorenmo, K., 2003. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 33, 573-+.
- Sorenmo, K.U., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H., 2000. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14, 266-270.
- Sorenmo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teige, J., Goldschmidt, M.H., 2009. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology* 7, 162-172.
- Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V., Goldschmidt, M.H., 2011. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology* 48, 85-97.
- Staiger, W.I., Coy, J.F., Grobholz, R., Hofheinz, R.D., Lukan, N., Post, S., Schwarzbach, M.H., Willeke, F., 2006. Expression of the mutated transketolase TKTL1, a molecular marker in gastric cancer. *Oncology Reports* 16, 657-661.
- StataCorp, 2009. *Stata Statistical Software: Release 11.2*. StataCorp LP, College Station, Texas.
- Steglich, G., Neupert, W., Langer, T., 1999. Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Molecular and Cellular Biology* 19, 3435-3442.
- Sternlicht, M.D., Kedeshian, P., Shao, Z.M., Safarians, S., Barsky, S.H., 1997. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clinical Cancer Research* 3, 1949-1958.
- Storlazzi, C.T., Lonoce, A., Guastadisegni, M.C., Trombetta, D., D'Addabbo, P., Daniele, G., L'Abbate, A., Macchia, G., Surace, C., Kok, K., et al., 2010. Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: origin and structure. *Genome Research* 20, 1198-1206.
- Stovring, M., Moe, L., Glatte, E., 1997. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *Apmis* 105, 590-596.
- Strategia dell'Unione Europea per la protezione e il benessere degli animali 2012-2015, http://ec.europa.eu/food/animal/welfare/actionplan/actionplan_en.htm
- Stratmann, N., Failing, K., Richter, A., Wehrend, A., 2008. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Veterinary Surgery* 37, 82-86.
- Stumpf, C.R., Ruggero, D., 2011. The cancerous translation apparatus. *Current Opinion in Genetics & Development* 21, 474-483.

- Tavares, W.L.F., Lavalle, G.E., Figueiredo, M.S., Souza, A.G., Bertagnolli, A.C., Viana, F.A.B., Paes, P.R.O., Carneiro, R.A., Cavalcanti, G.A.O., Melo, M.M., et al., 2010. Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica* 52.
- Tebbutt, N., Pedersen, M.W., Johns, T.G., 2013. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. *Nature Reviews Cancer* 13, 663-673.
- Terashima, M., Kim, K.M., Adachi, T., Nielsen, P.J., Reth, M., Kohler, G., Lamers, M.C., 1994. The IgM antigen receptor of B-Lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein. *Embo Journal* 13, 3782-3792.
- Terra, M.E., Marcela, M.M., Rodrigues, P., Magalhaes G.M., Costa, M.T., Amorim, R.L., Rocha, N.S., 2012. Immunohistochemical Expression of p53 and p63 in adenomas and carcinomas of canine mammary glands. *Open Journal of Veterinary Medicine* 2, 21-24.
- Terrestrial Animal Health Code of the World Organisation for Animal Health (OIE), Chapter 7.1 Anex 2A, (2013) <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>
- Theiss, A.L., Sitaraman, S.V., 2011. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1813, 1137-1143.
- Thomas, A.A., De Meese, J., Le Huerou, Y., Boyd, S.A., Romoff, T.T., Gonzales, S.S., Gunawardana, I., Kaplan, T., Sullivan, F., Condroski, K., et al., 2008. Non-charged thiamine analogs as inhibitors of enzyme transketolase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18, 509-512.
- Todd, R., Wong, D.T.W., 1999. Oncogenes. *Anticancer Research* 19, 4729-4746.
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., Bustin, S.A., Orlando, C., 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry* 309, 293-300.
- Tsai, H.W., Chow, N.H., Lin, C.P., Chan, S.H., Chou, C.Y., Ho, C.L., 2006. The significance of prohibitin and c-Met/hepatocyte growth factor receptor in the progression of cervical adenocarcinoma. *Human Pathology* 37, 198-204.
- Turner, L.B., 2011. A Meta-analysis of fat intake, reproduction, and breast cancer risk: an evolutionary perspective. *American Journal of Human Biology* 23, 601-608.
- Turner, N.J., 2000. Applications of transketolases in organic synthesis. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 527-531.
- Tyers, M., Mann, M., 2003. From genomics to proteomics. *Nature* 422, 193-197.
- Ullrich, A., Schlessinger, J., 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase-activity. *Cell* 61, 203-212.

- Ummanni, R., Junker, H., Zimmermann, U., Venz, S., Teller, S., Giebel, J., Scharf, C., Woenckhaus, C., Dombrowski, F., Walther, R., 2008. Prohibitin identified by proteomic analysis of prostate biopsies distinguishes hyperplasia and cancer. *Cancer Letters* 266, 171-185.
- Universal Protein Resource – UniProt, <http://www.uniprot.org/uniprot/O18735>
- Van de Rijn, M., Perou, C.M., Tibshirani, R., Haas, P., Kallioniemi, C., Kononen, J., Torhorst, J., Sauter, G., Zuber, M., Kochli, O.R., et al., 2002. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *American Journal of Pathology* 161, 1991-1996.
- Van Kouwenhove, M., Kedde, M., Agami, R., 2011. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nature Reviews Cancer* 11, 644-656
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3.
- Vargo-Gogola, T., Rosen, J.M., 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews Cancer* 7, 659-672.
- Vascellari, M., Baioni, E., Ru, G., Carminato, A., Mutinelli, F., 2009. Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *Bmc Veterinary Research* 5.
- Vessal, M., Mishra, S., Moulik, S., Murphy, L.J., 2006. Prohibitin attenuates insulin-stimulated glucose and fatty acid oxidation in adipose tissue by inhibition of pyruvate carboxylase. *Febs Journal* 273, 568-576.
- Vivanco, I., Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2, 489-501.
- Vogel, C., Marcotte, E.M., 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* 13, 227-232.
- Wang, J., Zhang, X., Ma, D., Lee, W.N., Xiao, J., Zhao, Y., Go, V.L., Wang, Q., Yen, Y., Recker, R., et al., 2013. Inhibition of transketolase by oxythiamine altered dynamics of protein signals in pancreatic cancer cells. *Exp Hematol Oncol* 2, 18.
- Wang, S., Nath, N., Adlam, M., Chellappan, S., 1999. Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene* 18, 3501-3510.
- Wang, S., Fusaro, G., Padmanabhan, J., Chellappan, S.P., 2002. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene* 21, 8388-8396.
- Warburg, O., 1956a. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.
- Warburg, O., 1956b. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.

- Weinberg, R.A., 1996. How cancer arises. *Scientific American* 275, 62-70.
- Weinstein, I.B., Joe, A.K., 2006. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology* 3, 448-457.
- Weyandt, J., Ellsworth, R.E., Hooke, J.A., Shriver, C.D., Ellsworth, D.L., 2008. Environmental chemicals and breast cancer risk - a structural chemistry perspective. *Current Medicinal Chemistry* 15, 2680-2701.
- Wheelock, M.J., Johnson, K.R., 2003. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19, 207-235.
- Whiteaker, J.R., Lin, C.W., Kennedy, J., Hou, L.M., Trute, M., Sokal, I., Yan, P., Schoenherr, R.M., Zhao, L., Voytovich, U.J., et al., 2011. A targeted proteomics-based pipeline for verification of biomarkers in plasma. *Nature Biotechnology* 29, 625-U108.
- Wiebe, J.P., 2006. Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 13, 717-738.
- Williams, A.C., Collard, T.J., Paraskeva, C., 1999. An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 18, 3199-3204.
- Withrow, S.J. 2007. Why worry about cancer in pets?. In: Withrow, S.J., MacEwen, E. (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology*, 4th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA
- Wittig, R., Coy, J.F., 2008. The role of glucose metabolism and glucose-associated signalling in cancer. *Perspect Medicin Chem* 1, 64-82.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., et al., 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 131, 18-43.
- Wu, T.F., Wu, H., Wang, Y.W., Chang, T.Y., Chan, S.H., Lin, Y.P., Liu, H.S., Chow, N.H., 2007. Prohibitin in the pathogenesis of transitional cell bladder cancer. *Anticancer Research* 27, 895-900.
- Wurth, L., 2012. Versatility of RNA-Binding proteins in cancer. *Comparative and Functional Genomics*.
- Xu, R.H., Pelicano, H., Zhou, Y., Carew, J.S., Feng, L., Bhalla, K.N., Keating, M.J., Huang, P., 2005. Inhibition of glycolysis in cancer cells: A novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Research* 65, 613-621.

- Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T., Toyoshima, K., 1986. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319, 230-234.
- Yang, A.N., Kaghad, M., Wang, Y.M., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., McKeon, F., 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular Cell* 2, 305-316.
- Yeh, I.T., Mies, C., 2008. Application of immunohistochemistry to breast lesions. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 132, 349-358
- Zaidan Dagli, M.L., 2008. The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: A promising outlook. *Veterinary Journal* 177, 3-5.
- Zastre, J.A., Sweet, R.L., Hanberry, B.S., Ye, S., 2013. Linking vitamin B1 with cancer cell metabolism *Cancer & Metabolism* 1, 16
- Zhang, E.Y., Cristofanilli, M., Robertson, F., Reuben, J.M., Mu, Z., Beavis, R.C., Im, H., Snyder, M., Hofree, M., Ideker, T., et al. 2013. Genome wide proteomics of ERBB2 and EGFR and other oncogenic pathways in inflammatory breast cancer. *J Proteome Res* 12, 2805-2817.
- Zhang, S., Yue, J.X., Yang, J.H., Cai, P.C., Kong, W.J., 2008. Overexpression of transketolase protein TKTL1 is associated with occurrence and progression in nasopharyngeal carcinoma (Retracted Article. See vol 10, pg 110, 2010). *Cancer Biology & Therapy* 7, 517-522.
- Zhao, J., Zhong, C.J., 2009. A review on research progress of transketolase. *Neurosci Bull* 25, 94-99.
- Zhou, B.P., Hung, M.C., 2003. Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. *Seminars in Oncology* 30, 38-48.
- Zhou, T.B., Qin, Y.H., 2013. Signaling pathways of prohibitin and its role in diseases. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 33, 28-36.

Ringraziamenti

Le scienze naturali, come pure le scienze sociali, partono sempre da problemi;

da ciò che in qualche modo suscita la nostra meraviglia

Karl Popper, Tutta la vita è risolvere problemi

Durante questi tre anni ho avuto la fortuna ed il piacere di poter lavorare e collaborare con tante persone a cui v'è la mia profonda stima ed il mio più prezioso ringraziamento.

Voglio ringraziare la Dott.ssa Elisabetta Antuofermo docente guida e maestro di vita che mi ha trasmesso, in questi anni, la passione per la ricerca e per lo studio.

Un ringraziamento v'è alla Dott.ssa Maria Filippa Addis, al Dott. Alessandro Tanca, al Dott. Marcello Abbondio, al Dott. Salvatore Pisanu e alla Dott.ssa Daniela Pagnozzi per le analisi proteomiche e per il loro imprescindibile sostegno nella valutazione dei risultati.

Un sentito ringraziamento alla Prof. Maria Rosaria De Miglio per gli esperimenti di real time PCR e per i suoi preziosi suggerimenti.

Desidero ringraziare la Dott.ssa Tiziana Cubeddu per gli innumerevoli contributi scientifici apportati a questo lavoro e la Dott.ssa Marina Sanna per aver curato la parte istopatologica, così come tutti i componenti della sezione di Anatomia Patologica per la loro disponibilità e gentilezza durante questi anni.

In fine, vorrei ringraziare Daniela e la mia Famiglia supporti e sostegni fondamentali in tutti i momenti difficili, e soprattutto Giampiero a cui dedico questo lavoro e a cui v'è il mio più affettuoso ricordo.