

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute  
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in  
Medicina Veterinaria

**Analisi immunoistochimica dell'espressione  
di YAP/TAZ nel tumore mammario del cane  
e del gatto**

Relatore  
Prof.ssa Valentina Zappulli

Laureando  
Massimiliano Didier Zulpo  
Matricola n. 597770/MV

ANNO ACCADEMICO 2013/2014



## INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Il tumore mammario</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 Epidemiologia nel cane e nel gatto .....	5
1.1.2 Presentazione clinica nel cane e nel gatto .....	7
1.1.3 Staging e fattori prognostici.....	8
1.1.4 Classificazione e grado .....	9
<b>1.2 Cellule staminali normali e cellule staminali tumorali</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 Cellule staminali e ghiandola mammaria umana .....	12
1.2.1.2 Cellule staminali e ghiandola mammaria del cane e del gatto .....	13
1.2.2 La terapia contro le cellule staminali tumorali.....	14
<b>1.3 Epithelial-Mesenchymal transition</b> .....	<b>15</b>
1.3.1 Epithelial-Mesenchymal transition nello sviluppo .....	16
1.3.2 Epithelial-Mesenchymal transition e cellule staminali tumorali.....	17
1.3.3 Epithelial-Mesenchymal transition e Mesenchymal-Epithelial transition .....	19
<b>1.4 YAP e TAZ</b> .....	<b>20</b>
1.4.1 Identificazione di YAP e TAZ.....	20
1.4.2 Regolazione e Regolatori di YAP, TAZ e Hippo .....	22
1.4.2.1 Hippo .....	22
1.4.2.2 Le implicazioni di YAP e TAZ nella polarità apico-basale .....	24
1.4.2.3 Le interazioni di YAP e TAZ, Hippo con i recettori accoppiati a proteine G.....	26
1.4.2.4 Matrice extracellulare, citoscheletro e YAP e TAZ .....	27
1.4.3 YAP e TAZ nella biologia tumorale .....	30
1.4.3.1 Il conferimento di proprietà staminali al tumore mammario da parte di TAZ .....	33
1.4.4 Il legame tra YAP, TAZ e la Wnt/ $\beta$ -catenina .....	33
1.4.5 YAP e TAZ nella terapia tumorale .....	36
<b>2 SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>39</b>
<b>3 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1 Campioni e raccolta dati</b> .....	<b>41</b>
<b>3.2 Immunoistochimica</b> .....	<b>42</b>
3.2.1 Valutazione delle positività .....	43
3.2.2 Scoring .....	43
<b>3.3 Analisi Statistica</b> .....	<b>44</b>

<b>3.4 Western blot .....</b>	<b>45</b>
3.4.1 Preparazione del campione .....	45
3.4.2 Elettroforesi .....	46
3.4.3 Western Blot .....	47
<b>4 RISULTATI .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Anamnesi .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Istopatologia .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Immunoistochimica .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4 Western Blot.....</b>	<b>64</b>
<b>4.5 Analisi statistica .....</b>	<b>67</b>
<b>5 DISCUSSIONE .....</b>	<b>77</b>
<b>6 CONCLUSIONE .....</b>	<b>87</b>
<b>APPENDICE I.....</b>	<b>89</b>
<b>APPENDICE II.....</b>	<b>91</b>
<b>APPENDICE III.....</b>	<b>93</b>
<b>APPENDICE IV.....</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>101</b>

## RIASSUNTO

Il progredire della ricerca scientifica nel campo delle neoplasie sta dimostrando, in modo sempre più inconfutabile, che alla base di molti tumori, tra i quali il tumore mammario, esiste una sotto-popolazione cellulare staminale. Questa popolazione resiste alle normali terapie ed è in grado, non solo di dare origine alla neoplasia stessa, ma anche di supportarne lo sviluppo, garantirne la proliferazione e di generare metastasi, che spesso sono la causa di morte anche quando il tumore primario viene curato. Secondo alcuni studi una neoplasia può iniziare il suo sviluppo grazie alla presenza di cellule staminali aberranti supportate da un microambiente favorevole. In determinate situazioni, invece, sono cellule più o meno differenziate a subire una riprogrammazione genetica, regredendo a cellule staminali tumorali e dando, in tal modo, origine al tumore.

La via di segnale Hippo, identificata per la prima volta nella *Drosophila* e oggetto di studio in medicina umana, gioca un ruolo fondamentale sia nella regolazione dello sviluppo degli organi sia nel blocco della proliferazione e dello sviluppo tumorale. Recentemente i co-attivatori di fattori di trascrizione YAP e TAZ, che generalmente questa via di segnale dovrebbe inibire, sono stati correlati al conferimento di caratteristiche staminali ad alcune cellule del tumore mammario. La sovra-espressione di queste due proteine promuove la proliferazione cellulare e la transizione epiteliale-mesenchimale in molte neoplasie. Nuovi studi, stanno rivelando quanto i meccanismi che comportano la defosforilazione di YAP e TAZ, con la loro conseguente attivazione e traslocazione a livello nucleare per modulare determinati fattori di trascrizione, siano molto più complessi e spesso indipendenti dalla stessa Hippo, coinvolgendo anche fattori implicati nella biomeccanica cellulare e altri *pathway* più conosciuti come per esempio quello Wnt/ $\beta$ -catenina. Indipendentemente dalla complessità di questi processi, il ruolo che YAP e TAZ svolgono nei tumori mammari del cane e del gatto è attualmente sconosciuto in letteratura.

In questo studio è stata analizzata la presenza di YAP e TAZ in 44 neoplasie mammarie maligne suddivise in sette classificazioni equamente ripartite, di cui tre feline e quattro canine, con particolare interesse nei confronti del loro comportamento nelle diverse classi istologiche, nei diversi gradi e nelle due diverse specie,

evidenziando, inoltre, eventuali similitudini o divergenze con la ghiandola mammaria sana e con il tumore al seno della donna.

L'analisi è stata condotta tramite western blot e immunocistochemica. Poiché i sistemi di valutazione del punteggio di quest'ultima, in medicina veterinaria, non hanno ancora trovato una chiara standardizzazione, sono stati utilizzati e comparati gli otto metodi di *scoring* normalmente accettati in letteratura, al fine di evidenziare eventuali similitudini e/o differenze.

Il western blot ha rivelato un profilo molto simile tra cane, gatto e donna. L'immunocistochemica, invece, ha dimostrato che YAP e TAZ sono presenti, con caratteristiche peculiari, anche in tessuti sani, ma che nei tessuti tumorali sono aumentati e, soprattutto, vengono traslocati nei nuclei delle cellule. Sia nelle neoplasie mammarie canine sia in quelle feline sono state riscontrate espressioni nucleari di YAP e TAZ percentualmente più numerose nelle cellule luminali dei carcinomi di grado III rispetto a quelli di grado I, pur rimanendo presente in tutti i campioni un'analogia positività citoplasmatica. I carcinomi complessi hanno manifestato, indipendentemente dall'aggressività del tumore e in entrambe le specie oggetto dello studio, colorazioni nucleari simili a livello delle popolazioni cellulari mioepiteliali.

Concludendo, in questo lavoro di tesi, si è visto come YAP e TAZ siano espressi in modo simile nei tumori mammari del cane, del gatto e della donna. Si può pertanto immaginare come uno studio comparato potrebbe, in futuro, divenire di notevole utilità, non solo per gli animali domestici, ma anche per l'essere umano, in quanto cani e gatti potrebbero essere degli ottimi modelli spontanei della patologia

## ABSTRACT

Scientific progress in the area of cancer is proving, with increasing evidence, that at the base of many tumors, along with the human breast cancer, there is a stem cells sub-population. This population is resistant to standard therapies and can give rise to the tumor itself, support its development, ensure its proliferation and, above all, originate metastasis, which the latter are often the cause of death even when the primary tumor is treated. According to some studies, indeed, neoplasm can start its development due to the presence of aberrant stem cells, supported by favorable microenvironment. In certain situations, however, more or less differentiated cells can undergo genetic reprogramming, regressing to cancer stem cells and giving, in this way, origin at the tumor.

The Hippo pathway, identified for the first time in *Drosophila* and studied in human medicine, plays a key role both in the regulation of organ growth and in blocking tumor proliferation and development. Lately the transcription factors co-activators of this signaling pathway, YAP and TAZ, were related to the conferment of cancer stem cell-related traits on several breast cancer cells. The overexpression of these two proteins promotes cell proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition in many neoplasias. New studies, moreover, are revealing since the mechanisms which lead to the YAP and TAZ dephosphorylation, with their consequent activation and translocation in nucleus for modulate certain transcription factors, are much more complex and often independent from the same Hippo, also involving factors implicated in cellular biomechanics and other pathways best known as the Wnt/ $\beta$ -catenin. Regardless of the complexity of these processes, the role of YAP and TAZ in canine and feline mammary tumors is currently unknown in literature.

In this study, we investigated the presence of YAP and TAZ in 44 malignant breast tumors, divided into seven categories, of which three feline and four canine, with particular interest in their behavior in different histological classifications, in different grading systems and in the two different species, pointing out, moreover, any similarities or differences with the healthy mammary gland and with the breast cancer in the woman.

The analysis was conducted by using western blot and immunohistochemistry methods. Since the scoring normally used in the latter, in veterinary medicine, have not yet found a clear standardization, were used and compared the eight scoring systems normally accepted in the literature, in order to highlight possible similarities and/or differences. Western blot analysis revealed a similar profile between dog, cat and woman. Immunohistochemistry showed, however, that YAP and TAZ are present, with particular characteristics, even in healthy tissues, but increase in tumor tissues and above all at the nuclear level. Both in canine mammary tumors and in those feline were found YAP and TAZ nuclear expression in percentage more numerous in grade III carcinomas luminal cells than grade I, while showing, in all samples, similar cytoplasmic positivity. Complex carcinomas showed, regardless of tumor aggressiveness and in both species, similar nuclear staining in myoepithelial cell populations.

In conclusion, in this thesis, it was seen as YAP and TAZ were similarly expressed in canine, feline and human mammary tumors. It can therefore imagine as a comparative study could, in future, become very useful, not only for pets, but also for the human beings, as dogs and cats may become excellent spontaneous models of disease.

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Il tumore mammario

### 1.1.1 Epidemiologia nel cane e nel gatto

Il tumore mammario, nella femmina adulta intera di cane, rappresenta la neoplasia più frequente, contrariamente a quanto avviene nel maschio nel quale è una rarità. Nonostante vi siano pareri molto discordanti in letteratura a riguardo, all'incirca metà dei tumori mammari sono maligni e hanno già metastatizzato al momento della diagnosi, con un'incidenza di mortalità dei pazienti che si colloca tra il 2% e il 20% (Gilbertson *et al.*, 1983; Moulton *et al.*, 1970; Misdorp, 2002; Withrow e MacEwen, 2007).

Nel cane l'età media di presentazione di una neoplasia mammaria è tra gli 8 e gli 11 anni, con un aumento dell'incidenza già dopo i 6. I giovani sotto i 5 anni sono più raramente interessati, e generalmente si tratta di neoplasie benigne in animali che hanno subito trattamenti ormonali progestinici (Taylor *et al.*, 1976; Pérez-Alenza *et al.*, 2000; Sorenmo *et al.*, 2009). Va ricordato, tuttavia, che in talune specie lo sviluppo di una neoplasia mammaria può avvenire precocemente rispetto alla media, come nel caso dell'English Springer Spaniel (ESS), nel quale l'età media di sviluppo neoplastico si aggira intorno ai 6 anni (Egenvall *et al.*, 2005).

È risaputo che i carcinomi mammari canini potrebbero rappresentare un buon modello per lo studio di quelli umani, emulandone epidemiologia, presentazione clinica, morfologia e spesso prognosi (Bizunesh *et al.*, 2013). Uno dei punti in comune di maggior interesse tra i due è senza dubbio la dipendenza dallo sviluppo ormonale (Schneider *et al.*, 1969); gli ormoni sessuali giocano un ruolo importantissimo, con enormi differenze di incidenza neoplastica riscontrabili tra femmine castrate e intere in correlazione all'età in cui avviene l'ovariectomia. È noto, infatti, che l'incidenza di tumore mammario si aggira intorno allo 0,05% in femmine castrate precedentemente al primo estro, aumenta fino all'8% se castrate dopo il primo calore, e addirittura raggiunge il 26% se castrate dopo il secondo. Qualora l'ovariectomia avvenga dopo questo periodo, il rischio di sviluppare un tumore alla mammella per questi animali è simile a quello riscontrato nelle femmine intere (Schneider *et al.*, 1969; Sorenmo *et al.*, 2011).

Si ritiene che la familiarità nello sviluppo di tumori mammari sia una prerogativa umana, tuttavia, è stata individuata da Patricio Rivera e colleghi (2009) la presenza di

un *pattern* ereditario nell'English Springer Spaniel (ESS). Nella donna, le mutazioni ereditarie nei geni BRCA1 e 2 possono aumentare fino all'84% il rischio di sviluppare un tumore mammario (Rivera *et al.*, 2009). Allo stesso modo mutazioni nei geni omologhi di BRCA1 e 2 nel cane portano ad un simile aumento della probabilità di sviluppo di un tumore mammario anche nell'English Springer spaniel (Rivera *et al.*, 2009). Sono certamente necessari ulteriori studi per capire se questa correlazione sia presente anche in altre razze.

L'incidenza dei tumori mammari nel cane secondo alcuni studi sembrerebbe legata alla razza. Nonostante i tumori mammari possano svilupparsi in qualsiasi femmina, i cani di taglia piccola come Chihuahua, Beagle, West Highland White Terrier, Yorkshire Terrier ecc., sono molto più colpiti da questa patologia (Sorenmo *et al.*, 2011). Anche alcune razze di cani di taglia più grande possono manifestare la stessa predisposizione, sebbene ogni informazione sull'incidenza di una patologia applicata ai singoli morfotipi di una popolazione canina vada interpretata in base alla diversa distribuzione territoriale di questa in un determinato paese; esistono, pertanto, risultati ed opinioni discordanti in letteratura riguardo l'effettiva esistenza di una predisposizione di razza (Sorenmo *et al.*, 2011).

Sonnenschein e colleghi (1991) hanno individuato una significativa diminuzione del rischio di sviluppo di tumore alla mammella in cani che si presentano magri all'età di 9-12 mesi, anche se cani obesi un anno prima della comparsa del tumore non sembrano mostrare un significativo aumento del rischio. Un ulteriore studio ha dimostrato che una dieta casalinga ricca di carni rosse e cibi grassi può aumentare il rischio di sviluppare un tumore alla mammella rispetto ad una dieta commerciale (Perez *et al.*, 1998). Questi dati indicherebbero che la dieta nei primi anni di vita del cane influenzi maggiormente il rischio di sviluppare tumore mammario e si presume che l'obesità, almeno in medicina umana e nelle donne in menopausa, aumenti i livelli circolanti di estrogeni e l'attività aromatasica (Cleary *et al.*, 2009), favorendo, in questo caso, la neoplasia.

Il 12% delle neoplasie maligne feline sono tumori mammari e questo dato sale al 17% se si considerano solo le femmine (Hayes e Mooney, 1985). Normalmente lo sviluppo di tumori mammari avviene prevalentemente tra i 10 e i 12 anni, con un aumento del rischio oltre i 14; inoltre, sembra esistere una proporzionalità diretta tra l'età e il grado di malignità del tumore stesso (Hayes e Mooney, 1985; Hughes *et al.*, 2012; Midsorp *et al.*, 1991; Weijer *et al.*, 1993). Nel gatto siamese è stata registrata una

predisposizione di razza che abbassa a 7 anni l'età in cui vi è un aumento significativo della probabilità di sviluppare il tumore (Hayes *et al.*, 1981).

È degno di nota il fatto che sono stati riscontrati tumori mammari con comportamento aggressivo, non solo nelle gatte, ma anche nei maschi (Skorupski *et al.*, 2005).

Come nel cane, anche nel gatto sembrerebbe esserci differenza di incidenza nello sviluppo tumorale tra gatte castrate e intere: in uno studio di Overley e colleghi (2005) viene attribuita una diminuzione di tale rischio del 91% in gatte che hanno subito ovariectomia prima dei 6 mesi e dell'85% sotto l'anno di vita. Contrariamente, il trattamento progestinico influenzerebbe negativamente qualsiasi calcolo epidemiologico (Hayden *et al.*, 1989; Skorupski *et al.*, 2005).

Le forme maligne di tumore mammario nei gatti sono per la maggior parte indipendenti dagli ormoni, vengono classificate di tipo semplice (normalmente composti da una sola tipologia cellulare) e hanno un comportamento aggressivo (Hayden *et al.*, 1989; Misdorp *et al.*, 1999; Nielsen, 1977). La maggior parte dei tumori mammari nel gatto va rapidamente incontro a metastasi nei linfonodi regionali, nei polmoni, nel fegato e nella pleura (Hahn *et al.*, 1977; Hahn *et al.*, 1994).

### **1.1.2 Presentazione clinica nel cane e nel gatto**

Normalmente più del 70% dei cani con neoplasia mammaria presenta contemporaneamente più di un tumore (Sorenmo *et al.*, 2009). Le ghiandole più colpite sono le due paia caudali, mentre quelle ascellari sono le prime a presentare il tumore (Bender *et al.*, 1984).

Sebbene sia relativamente semplice identificare delle probabili neoplasie, data la loro natura nodulare, i segni clinici specifici dipendono dal comportamento biologico del tumore e dallo stadio di quest'ultimo. I linfonodi possono presentarsi di volume aumentato, ma generalmente non sono associati a sintomi sistemici, se non nel raro e aggressivo carcinoma infiammatorio (Marconato *et al.*, 2009; Perez-Alenza *et al.*, 2001).

Nei casi in cui siano presenti più tumori, questi possono avere varie dimensioni e varie caratteristiche istopatologiche, solitamente accomunate da una correlazione di proporzionalità diretta che associa le dimensioni alla malignità (Sorenmo *et al.*, 2009). Quest'ultima considerazione rafforza la teoria secondo la quale nel cane il tumore si

trasforma nel tempo da una forma benigna ad una maligna e che i carcinomi siano lo stadio finale di questo processo (Sorenmo *et al.*, 2009).

Nel gatto il tumore può presentarsi con noduli singoli o multipli, in una o più ghiandole. La frequenza di questa molteplicità nodulare sembrerebbe variare da un 7% in alcuni studi a un 60% in altri, tuttavia, spesso in letteratura non è chiarito se si tratti di lesioni indipendenti o semplici metastasi intramammarie dello stesso problema (Weijer e Hart, 1983). Le linee mammarie di destra o di sinistra non sembrano presentare sostanziali differenze di incidenza, mentre all'interno della stessa linea la ghiandola più craniale e quella più caudale sono quelle maggiormente interessate (Hahn *et al.*, 1994).

### 1.1.3 Staging e fattori prognostici

Lo *staging* si basa sul sistema TNM: tumore, linfonodi, metastasi. Le informazioni da raccogliere sulla neoplasia riguardano questi tre parametri e, in caso di più noduli nello stesso individuo, viene preso in considerazione quello con diametro maggiore e con caratteristiche di malignità superiori. I linfonodi, se palpabili o comunque aumentati di volume, devono essere analizzati alla citologia (Langenbach *et al.*, 2001). Le radiografie toraciche con tre proiezioni rimangono la possibilità più utilizzata, in medicina veterinaria, per indagare eventuali metastasi toracico/polmonari; nel cane, ad esempio, i polmoni rappresentano gli organi maggiormente colpiti dalla disseminazione neoplastica (Sorenmo *et al.*, 2011). Anche ecografie addominali e dello scheletro possono risultare utili nel caso in cui si sospettino metastasi in questi apparati (Sorenmo *et al.*, 2011).

I sistemi di staging proposti e pubblicati per i tumori mammari canini sono due, l'originale del WHO (Owens, 1980) e la versione modificata (Rutteman *et al.*, 2001).

In entrambi i metodi vengono utilizzate le informazioni ottenute su questi tre fattori:

1. Diametro tumorale. Nei sistemi di staging viene suddiviso in tre categorie (T1 <3 cm; T2: 3–5 cm; T3 >5 cm) ed è considerato un parametro importantissimo sia nel cane che nel gatto, indipendentemente dalle continue discussioni sul grado di influenza che svolge nella prognosi (Sorenmo *et al.*, 2011).
2. Linfonodi. Il sistema di *staging* del 2001 li classifica in N0 (privi di metastasi rilevabili) o N1 (con metastasi) sulla base della diagnosi istologica o citologica. Nel sistema del 1980, invece, viene inoltre preso in considerazione

se l'eventuale interessamento metastatico coinvolge il solo linfonodo ipsilaterale o anche il controlaterale.

3. Metastasi. Entrambi i sistemi di staging concordano nel suddividere in M0 e M1 la presenza o meno di metastasi.

I sistemi di staging normalmente utilizzati, sono schematizzati in appendice I.

#### **1.1.4 Classificazione e grado**

Nel 1974 l'Organizzazione Mondiale della Sanità pubblicò per la prima volta la "Classificazione Istologica Internazionale dei Tumori degli Animali Domestici", un tentativo iniziale di standardizzare e uniformare quelli che fino ad allora erano stati studi isolati. Nel 1999 venne aggiornata e modificata. Con il progredire delle ricerche in questo campo, la scoperta di nuove forme tumorali e l'ampliamento delle conoscenze sulle singole tipologie di neoplasie mammarie, è stata proposta una terza classificazione a cura di Goldschmidt e colleghi (2011).

Per il gatto viene mantenuta la classificazione ufficiale del 1999 del WHO con alcune recenti modifiche, tra cui l'aggiunta di una particolare categoria di "carcinomi complessi" che Zappulli e colleghi (2013) hanno proposto di eliminare per lasciare spazio a due nuove forme, i carcinomi duttali ed i carcinomi papillari-intraduttali. In particolare, il sottotipo duttale contiene una duplice popolazione di cellule epiteliali luminali e una di cellule basali/mioepiteliali organizzate in cordoni separati da piccole fessure. È quest'ultima popolazione a destare interesse, dato che le cellule mantengono una morfologia sopra-basale, diversamente dal cane nel quale i carcinomi complessi possiedono un mioepitelio in fase di espansione nell'interstizio e con una caratteristica differenziazione morfologica (Zappulli *et al.*, 2013). Altre modifiche alla classificazione felina sono state introdotte con la scoperta del carcinoma infiammatorio, del tutto simile a quello del cane e della donna (Perez-Alenza *et al.*, 2001), del carcinoma micropapillare invasivo felino (Seixas *et al.*, 2007) e del carcinoma *lipid-rich* (Kamstock *et al.*, 2005).

I carcinomi invasivi vengono suddivisi in base al loro grado di differenziazione, comportando una valutazione semi-quantitativa delle caratteristiche morfologiche basata su un protocollo standard; si prendono in considerazione, infatti, il grado di formazione dei tubuli, il pleomorfismo cellulare e nucleare e l'indice mitotico. Per ognuno di questi tre valori viene attribuito un punteggio da uno a tre dettato dal metodo utilizzato. Il valore finale, che si ottiene sommando i risultati dei tre parametri,

categorizza la neoplasia in tre gradi, con crescente malignità, da un tumore ben differenziato ad uno scarsamente differenziato (Goldschmidt *et al.*, 2011).

I sistemi di *grading* attualmente impiegati nel cane per il tumore mammario sono modificazioni del primo sistema basato sull'Ellston & Ellis, utilizzato nella donna (Karayannopoulou *et al.*, 2005). Sebbene ci siano solo lievi differenze tra il metodo Peña (Clemente *et al.*, 2010) e il metodo Misdorp (Misdorp, 2002) non si conosce ancora come queste possano influenzare la prognosi, soprattutto nel caso del grado intermedio, che rappresenta tumori moderatamente differenziati (Goldschmidt *et al.*, 2011). Indipendentemente dall'utilizzo di un metodo rispetto all'altro, Karayannopoulou e colleghi (2005) hanno dimostrato l'esistenza di notevoli discrepanze nella sopravvivenza tra grado I (prognosi più favorevole) e i grado II e III (prognosi infausta). Nel gatto, invece, esiste un sistema rivisitato da Castagnaro e colleghi (1998) che si basa anch'esso sull'Elston & Ellis umano.

Le metodiche di attribuzione del grading sono schematizzate in appendice II.

## **1.2 Cellule staminali normali e cellule staminali tumorali**

Le cellule staminali sono cellule che hanno la capacità di perpetuarsi attraverso l'auto-rinnovamento e di differenziarsi assumendo quelle che sono le caratteristiche fenotipiche e genotipiche delle cellule di un determinato tessuto. Le popolazioni cellulari che derivano dalle cellule staminali sono organizzate su base gerarchica (Jordan *et al.*, 2006).

Le cellule staminali possiedono tre proprietà caratterizzanti. La prima è senza dubbio l'auto-rinnovamento, ovvero la capacità di dividersi asimmetricamente in modo che una delle due cellule figlie rimanga uguale alla cellula parentale, mentre l'altra subisca un processo di determinazione in base alla tipologia di tessuto; seguono poi la capacità di poter dare origine a molte linee cellulari e la capacità di proliferazione quasi illimitata. La combinazione di queste peculiarità esprime la loro unicità (Pardal *et al.*, 2003).

Le cellule staminali possono essere suddivise in tre principali categorie: embrionali, germinali e somatiche. Le embrionali derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti: sono totipotenti, precursori di tutte le cellule dell'organismo, possono moltiplicarsi in modo illimitato in vitro, mentre, in vivo, per tutta la durata della vita dell'animale; questa caratteristica è dovuta all'azione dell'enzima telomerasi (Soltysova *et al.*, 2005) che aggiunge sequenze ripetitive di DNA non codificante a livello di

telomeri, assicurandone quindi l'integrità. Le cellule staminali germinali consentono la produzione di cellule uovo e spermatozoi. Le cellule staminali somatiche svolgono la loro funzione biologica nel corso dell'esistenza dell'individuo (Soltysova *et al.*, 2005), dividendosi in modo simmetrico durante la prima parte della vita embrionale e asimmetricamente nelle fasi successive (Sherley, 2002). In generale, si può affermare che le cellule staminali somatiche si trovano in siti, denominati "nicchie", spazialmente determinati all'interno di un tessuto, dove svolgono un'azione di supporto e di regolazione del microambiente (Fuchs *et al.*, 2004). La caratteristica più importante delle cellule in esame è senza dubbio la capacità di moltiplicarsi senza perdere l'attitudine proliferativa nel tempo e soprattutto nello spazio, anche quando le loro vicine più differenziate sono in uno stadio di quiescenza, riuscendo persino a bypassare il normale *checkpoint* G1/S tramite l'espressione di micro-Rna regolatori (Hatfield *et al.*, 2005).

La prima connessione tra cancro e cellule staminali fu presa in considerazione quando si iniziarono a notare similitudini tra tessuto embrionale e neoplasie (Askanazi *et al.*, 1907). Fu solo dopo la scoperta della presenza di cellule staminali nei tumori emopoietici che si iniziò ad indagare la relazione tra cellule staminali e cancro anche nelle neoplasie "solide", soprattutto quelle di tessuti soggetti a rapido *turn over* cellulare e a proliferazione continua (Jordan *et al.*, 2006). Al-Hajj e colleghi (2003), proprio dal tumore mammario, isolarono le prime cellule staminali tumorali, identificando una piccola popolazione di cellule che erano positive alla presenza di CD44 e negative alla presenza di CD24 (CD44+CD24-), tipici *marker* superficiali delle cellule staminali della mammella sana (Al-Hajj *et al.*, 2003); la popolazione identificata, dopo essere stata iniettata a livello del tessuto adiposo mammario in un topo immunodeficiente, portò allo sviluppo di un tumore mammario in 8 casi ogni 9. In uno studio analogo, riguardante i gliomi, solo una determinata popolazione cellulare era in grado di propagare il tumore in vivo, e anche in questo caso si caratterizzava come CD44+CD24- (Jordan *et al.*, 2006).

Le cellule staminali tumorali (da qui in poi definite CSCs dall'inglese *cancer stem cells*) continuano a dividersi asimmetricamente creando, almeno in una prima fase, due differenti popolazioni, una delle quali mantiene le caratteristiche indifferenziate, mentre, l'altra, assume una differenziazione tumorale ma rimane incapace di dare inizio alla crescita della neoplasia (Jordan *et al.*, 2006).

L'origine delle CSCs e il loro ruolo all'interno del tumore è ancora oggi oggetto di dibattito. Alcuni studi dimostrano come una neoplasia possa svilupparsi a partire da una popolazione di cellule staminali aberrante che abbia acquisito caratteristiche oncogeniche (Shiras *et al.*, 2007). Tuttavia, in certi casi, sono cellule più o meno differenziate a subire riprogrammazione genetica, de-differenziandosi in cellule staminali tumorali e a dare, quindi, origine alla neoplasia (Jaiswal *et al.*, 2007).

### **1.2.1 Cellule staminali e ghiandola mammaria umana**

La ghiandola mammaria è un organo secretorio complesso, che comprende un'elaborata rete ramificata di dotti epiteliali immersi in un cuscinetto adiposo composto da adipociti, vasi sanguigni, cellule emopoietiche e fibroblasti. I dotti sono delineati da uno strato interno di cellule luminali epiteliali e da uno esterno di cellule basali mioepiteliali con capacità contrattili. I dotti terminano in piccoli “grappoli d'uva” (lobuli) che producono il latte (May *et al.*, 2011). Gli ormoni della gravidanza stimolano l'espansione e la differenziazione delle cellule luminali duttali in cellule che producono latte. Dopo lo svezzamento si ha l'involutione attraverso estesi fenomeni apoptotici e di rimodellamento tissutale (May *et al.*, 2011). La capacità dell'epitelio della ghiandola mammaria di espandersi e rimodellarsi durante la pubertà e la gravidanza implica la presenza di una popolazione residente di cellule staminali pluripotenti (Visvader *et al.*, 2009) in grado di poter rigenerare cellule luminali e mioepiteliali (Jeselson *et al.*, 2010). Si presume che una popolazione indifferenziata e insensibile agli estrogeni (MaSCs, da *mammary stem cells*) possa dare origine ad un comune progenitore delle due popolazioni sopra citate; in un secondo momento le cellule mioepiteliali si differenzierebbero caratterizzandosi, mentre le progenitrici delle luminali si differenzierebbero nelle duttali o nelle alveolari (Visvader *et al.*, 2009; Prat *et al.*, 2009).

La ghiandola mammaria si sviluppa in 3 distinti momenti: durante l'embriogenesi, anche se in modo rudimentale, durante la pubertà e durante la gravidanza. In pubertà lo sviluppo ramificato e l'allungamento duttale riempiono il cuscinetto adiposo mammario costituendo l'albero duttale e preparando la ghiandola mammaria che in gravidanza andrà incontro a crescita alveolare (Watson *et al.*, 2008). Questo allungamento inizia con la formazione dei “*Terminal End Buds*” (TEB). I TEB rappresentano una struttura epiteliale multi-stratificata iniziale che dà origine ai dotti e quindi alle due popolazioni luminale e mioepiteliale (Sternlicht *et al.*, 2006). È interessante notare che la

biforcazione dei TEB è regolata dagli stessi fattori che regolano la Transizione Epiteliale-Mesenchimale (vedi capitoli relativi), anche se l'esatto meccanismo d'azione deve essere ancora conosciuto nella sua complessità (Fata *et al.*, 2004).

#### **1.2.1.2 Cellule staminali e ghiandola mammaria del cane e del gatto**

Il compartimento stromale della ghiandola mammaria canina e felina si compone di cellule dislocate all'interno della matrice extracellulare (Li e Xie, 2005). Similmente all'essere umano anche nel cane e nel gatto è presente una rete ramificata di dotti immersa in un cuscinetto adiposo, per quanto la distribuzione quest'ultimo sia dotata di caratteristiche peculiari in ogni mammifero (Hovey *et al.*, 1999). La componente cellulare epiteliale forma l'albero duttale della ghiandola mammaria ed è costituita da due tipologie cellulari: l'epitelio luminale, che forma i dotti e gli alveoli, e l'epitelio basale, che si compone di cellule mioepiteliali (Bizunesh *et al.*, 2013).

Negli ultimi decenni l'esistenza di una nicchia staminale, che da origine alle diverse tipologie cellulari mammarie, è stata dimostrata nell'essere umano e nel topo, ma vi sono scarse informazioni riguardanti le altre specie. Il ruolo delle MaSCs nel cane e nel gatto è poco conosciuto, se si escludono gli studi improntati alla teoria delle CSCs, che considera il cancro una malattia di origine staminale, poichè le cellule staminali sono le uniche tipologie cellulari che possiedono una durata di vita tale da acquisire sufficienti mutazioni genetiche (Reya *et al.*, 2001). Cocola e colleghi (2009) sono stati i primi ad isolare le MaSCs e le CSCs dalla ghiandola mammaria canina. Queste cellule presentavano capacità di autorinnovamento, potenziale differenziativo, e potevano dare origine rispettivamente a strutture tubulari in vitro e neoplasie in vivo in topi immunodeficienti NOD/SCID (Cocola *et al.*, 2009). Sempre nello stesso lavoro l'analisi tramite western blot ha rivelato che le CSCs mammarie del cane erano chiaramente positive per i marcatori CD49f, CD133, p21 e CK14 e moderatamente positive per CD23 e CD44, ma non sono state riportate informazioni riguardanti le MaSCs. Successivamente Bizunesh e colleghi (2013) hanno dichiarato di aver isolato delle MaSCs positive per CD29, CD44 e CD49f, identificando nella glicoproteina di membrana CD44 un possibile marcatore staminale comune tra cane ed essere umano.

Il primo isolamento di cellule staminali tumorali nel gatto risale al 2009 (Penzo *et al.*, 2009) e, tramite immunofluorescenza, sono risultate anch'esse positive per CD44 (Barbieri *et al.*, 2012).

### 1.2.2 La terapia contro le cellule staminali tumorali

L'efficacia dell'attuale chemioterapia e della radioterapia si basa sulla distruzione della maggior parte della massa tumorale, tuttavia, sulla base dei numerosi studi svolti in medicina umana, l'inefficacia di queste stesse terapie contro le cellule staminali tumorali (CSCs) è ritenuta la potenziale causa di molte recidive (Ebben *et al.*, 2010).

Lo sviluppo di trattamenti specifici nei confronti delle CSCs rappresenta un importante traguardo, seppur molto complicato da raggiungere. Innanzitutto è fondamentale approfondire ulteriormente le attuali conoscenze sulle cellule staminali sane per isolarle da un determinato tessuto, caratterizzarle, e stabilire se un determinato xenobiotico sia specifico contro di esse (Jordan *et al.*, 2006). In secondo luogo, è indispensabile comprendere i meccanismi che rendono le CSCs differenti dalle loro controparti sane per quanto concerne la sopravvivenza e la risposta a danni subiti. Idealmente, infatti, una nuova terapia dovrebbe avere come bersagli dei *pathway* unici che caratterizzano le CSCs, possibilmente senza tralasciare un'analisi del motivo per cui gli attuali farmaci che aggrediscono la massa neoplastica risultino inefficaci contro queste cellule (Jordan *et al.*, 2006).

Un problema addizionale consiste nel poter eradicare le CSCs sulla base delle proprietà peculiari che queste assumono nei diversi tessuti. Le cellule staminali leucemiche, ad esempio, si trovano in uno stato quiescente rispetto alle normali controparti sane (Guan *et al.*, 2003; Guzman *et al.*, 2001; Terpstra *et al.*, 1996); di conseguenza molti farmaci citotossici usati in terapia che colpiscono le cellule a rapida divisione non possono eradicarle. Occorrerà, quindi, sintetizzare xenobiotici che colpiscano indipendentemente dalla velocità proliferativa cellulare (Guan *et al.*, 2003; Guzman *et al.*, 2001; Terpstra *et al.*, 1996).

Un'altra comune caratteristica che rende le CSCs più resistenti alle normali terapie sono le proteine associate all'efflusso di xenobiotici (Dean *et al.*, 2005), tra le quali gli *ATP binding cassette* (ABC) e i trasportatori *multi-drug resistance* (MDR) sono le maggiormente conosciute (Lou *et al.*, 2007). La resistenza alle radiazioni è invece garantita dall'attivazione di meccanismi di riparazione del DNA (Bao *et al.*, 2006) e dall'incredibile resistenza alle specie reattive dell'ossigeno (Diehn *et al.*, 2009).

Un concetto fondamentale da includere è che le cellule staminali normali sono più sensibili ai chemioterapici rispetto alle controparti neoplastiche. Le cellule staminali del colon, ad esempio, possono inibire i meccanismi di riparazione e attivare l'apoptosi in seguito ad un danno al DNA per impedire l'accumulo di ulteriori mutazioni (Cairns,

2002). È possibile, dunque, che successivi cicli terapeutici esacerbino questo processo provocando dei danni alla normale popolazione staminale e favorendo, di conseguenza, la popolazione tumorale. Risulta, pertanto, basilare non solo identificare nuovi farmaci, ma comprendere a fondo le conseguenze di quelli attuali (Jordan *et al.*, 2006).

Se la remissione clinica è ottenuta, la presenza di cellule staminali tumorali residuali può portare a ricaduta. Perciò, è necessario considerare differenti strategie nella preparazione di molecole contro queste specifiche cellule; dato che l'alterata regolazione della moltiplicazione asimmetrica rappresenta il fulcro del problema, si rivela essenziale conoscere e aggredire le cascate enzimatiche e le coordinazioni alla base dell'auto-rinnovamento, cercando possibilmente di scoprire quanto l'inibizione di questi meccanismi possa risultare tollerata, considerata la sua profonda implicazione biologica per la vitalità di ogni tessuto. Ammettendo che ciò sia possibile, non si può sapere se realmente si riesca a distruggere il tumore o semplicemente a sopprimere le CSCs (Ebben *et al.*, 2010).

Sebbene sia oggetto di molte ricerche l'identificazione di trattamenti contro le CSCs, non esiste ancora un *marker* universale per identificarle, considerando, inoltre, che gli ultimi studi rivelano in modo sempre più convincente l'eterogeneità dei tumori, con diverse popolazioni di CSCs a diversi gradi di differenziazione nel singolo tumore con differenze osservate anche nei singoli pazienti (Hermann *et al.*, 2007; Ebben *et al.*, 2010).

### **1.3 Epithelial-Mesenchymal transition**

Le CSCs sono implicate nelle fasi iniziali e di supporto della crescita tumorale, e soprattutto nella fase di metastasi. Diversi studi in medicina umana hanno collegato l'induzione dell'*Epithelial-Mesenchymal Transition* (EMT), o Transizione Epiteliale-Mesenchimale, con l'acquisizione di proprietà e funzioni molecolari tipiche delle CSCs (Mani *et al.*, 2008). Quindi, oltre a conferire il potenziale di migrazione ed invasione, l'induzione dell'EMT in cellule epiteliali mammarie, divenute immortali e radicalmente trasformate, aumenta significativamente la capacità di queste di autorinnovarsi, di dare origine ad un tumore e comporta l'espressione di *marker* tipici delle cellule staminali (Mani *et al.*, 2008). Sempre Mani e colleghi (2008) ritengono che, data la possibilità di induzione dell'EMT anche da parte di stimoli extracellulari e fattori ambientali o micro-ambientali, sia possibile la generazione *ex novo* di CSCs da cellule tumorali

differenziate, e che questa induzione sia un alternativo o addizionale passo verso la genesi tumorale. I tumori mammari, infatti, possono originare da cellule staminali normalmente presenti in un determinato tessuto o da precursori differenziati che hanno acquisito capacità di autorinnovamento. EMT gioca un ruolo ancora scarsamente conosciuto in questa dicotomia di sviluppo tumorale (Mani *et al.*, 2008).

### **1.3.1 Epithelial-Mesenchymal transition nello sviluppo**

Una delle più primitive divergenze nel fenotipo cellulare, fin dai primissimi organismi che hanno abitato la terra, è rappresentata dalla distinzione tra cellule epiteliali e mesenchimali. Le prime forniscono coesione intercellulare, una prerogativa fondamentale per l'integrità di strutture complesse, e creano una vera e propria barriera che contribuisce a mantenere relativamente stabile l'ambiente interno (Shoock *et al.*, 2003). Le seconde, presentando un fenotipo mesenchimale, offrono supporto e struttura a quelle epiteliali grazie alla produzione di matrice extracellulare e possiedono un'elevata capacità mobile e invasiva (Hay *et al.*, 2005). L'inter-conversione tra la fase di Transizione Epiteliale-Mesenchimale e la sua nemesi Mesenchimale-Epiteliale, non solo offre maggiore flessibilità durante l'embriogenesi, ma favorisce anche il dinamico rimodellamento tissutale proprio delle fasi di guarigione delle ferite (Shoock *et al.*, 2003).

Questo *switch* tra fenotipi è stato dimostrato in molti processi: gastrulazione, formazione della cresta neurale, palatogenesi, formazione delle valvole cardiache, nefrogenesi, miogenesi, nonché nella fibrosi epatica (Douglas *et al.*, 2010). È degno di nota che i meccanismi molecolari che riguardano l'EMT non differiscono particolarmente tra sano e patologico. Nell'adulto un epitelio quiescente non è in grado di compiere tale trasformazione, le cellule tumorali, invece, possono riattivare le proprietà cellulari tipiche dello sviluppo e garantire alla neoplasia una proliferazione accelerata, resistenza all'apoptosi e soprattutto il blocco della senescenza (Strizzi *et al.*, 2009). Curiosamente questo cambiamento non deve essere considerato in senso assoluto. È stato osservato, infatti, come esista, in molti casi, una forma di "migrazione collettiva" associata ad un aumento di plasticità cellulare. Ciò comporta il movimento di cellule epiteliali in gruppo, funzionalmente e fisicamente connesse (Rorth *et al.*, 2009). In sostanza, le giunzioni cellulari rimangono intatte, ma si notano alterazioni di polarità lungo l'asse apico-basale, modificazioni della matrice extracellulare e l'acquisizione di un comportamento invasivo; il tutto rappresenta una sorta di limbo tra due stati

fenotipici che risulta di fondamentale importanza, ad esempio, per lo sviluppo arboriforme dei dotti mammari (Micalizzi *et al.*, 2010). Questa profonda conversione è orchestrata da una complessa rete di vie di trasduzione e fattori di trascrizione che altera l'espressione di geni implicati nell'adesione cellulare, nella differenziazione e nella motilità (Micalizzi *et al.*, 2010).

L'EMT inizia con la perdita di polarità lungo l'asse apico-basale non appena le giunzioni strette tra cellule cedono. Le giunzioni aderenti e le *gap junction* si sganciano e la membrana basale viene degradata. Proteine di membrana come le E-caderine e le integrine, implicate nei raccordi tra cellule e tra queste con la membrana basale, vengono incluse per endocitosi, degradate a livello lisosomiale e rispettivamente sostituite da N-caderine e integrine, che forniscono proprietà adesive più blande (Thiery *et al.*, 2009; Prat *et al.*, 2010; Polyak *et al.*, 2009). La perdita di E-caderina contribuisce al rilascio, a livello citoplasmatico, della  $\beta$ -catenina e innesca l'attivazione della via canonica di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina. Non si tratta, quindi, di una variazione delle caratteristiche epiteliali, ma un'espressione *ex novo* di geni associati alle caratteristiche mesenchimali (Thiery *et al.*, 2009; Prat *et al.*, 2010; Polyak *et al.*, 2009). Gli elementi del citoscheletro vengono riorganizzati, l'actina periferica viene sostituita da *stress fibers*, mentre i filamenti intermedi di citocheratina vengono rimpiazzati da vimentina (Micalizzi *et al.*, 2010). La cellula, inoltre, acquisisce la capacità di muoversi nella matrice extracellulare ormai libera da contatti con le altre (Micalizzi *et al.*, 2010). Si presume che sia durante questo processo che le cellule epiteliali vengono rese resistenti all'anoichisi, una forma di morte cellulare programmata indotta dal distacco di cellule ancoraggio-dipendenti (Chaffer *et al.*, 2007; Peinado *et al.*, 2004; Townsend *et al.*, 2008). Concludendo, sebbene le caratteristiche di base nei vari scenari, patologici e non, siano simili, è stato recentemente proposto di fare una classificazione in 3 differenti sub-tipi di EMT: sviluppo (tipo I), fibrosi e guarigione delle ferite (tipo II) e cancro (tipo III) (Kalluri *et al.*, 2009).

### **1.3.2 Epithelial-Mesenchymal transition e cellule staminali tumorali**

È sorprendente il fatto che l'EMT, non solo induce quel comportamento invasivo che rende il tumore in grado di diffondersi nell'organismo, ma contribuisce alla progressione neoplastica attraverso lo sviluppo di particolari caratteristiche. Per esempio, studi recenti in oncologia umana rivelano una connessione tra l'EMT e l'induzione di un fenotipo staminale (Mani *et al.*, 2008). Queste analisi spingono a

chiedersi se l'EMT nel cancro rappresenti una trans-differenziazione di cellule epiteliali in mesenchimali o, piuttosto, una de-differenziazione in un fenotipo precedente. La prima sembra essere la possibilità più accreditata, dato che la cellula acquisisce capacità di *self-renewal*, resistenza alla senescenza, resistenza ai chemioterapici e persino di interagire con l'ambiente circostante, producendo citochine immunosoppressive. Tutte queste, infatti, sono peculiarità staminali (Kudo-Saito *et al.*, 2009).

I *pathway* come TGF- $\beta$  (tumor growth factor beta) o Wnt/ $\beta$ -catenina, i fattori di trascrizione e i micro-RNA inducono l'EMT attraverso molti circuiti, tra i quali l'espressione ectopica di SNAIL, TWIST o SLUG che conduce all'acquisizione di proprietà staminali, svolgendo, ad esempio, azioni dirette o indirette sulle E-cadherine (Mani *et al.*, 2008). Si è visto, inoltre, che l'espressione cronica della proteina omeobox Six 1 (codificata da un gene coinvolto nella regolazione delle procedure di sviluppo) nel tumore mammario del topo, ha generato un tumore aggressivo con caratteristiche di EMT-staminali, probabilmente portando all'attivazione della via di segnale Wnt/ $\beta$ -catenina (McCoy *et al.*, 2009).

Recentemente le crescenti conoscenze sui micro-RNA hanno portato ad avere una maggiore attenzione al ruolo che questi hanno anche nel contesto dell'EMT. I micro-RNA sono delle corte molecole di Rna non codificanti che regolano l'espressione genetica a livello post-trascrizionale (Talbot *et al.*, 2012). Nel complesso meccanismo dell'EMT i micro-RNA sono spesso coinvolti in azioni di feedback negativo all'interno di famosi *pathway* come quelli sopra citati, funzionando quindi come repressori genetici, impedendo la traslazione e l'espressione di determinati geni spesso associati ad EMT (Talbot *et al.*, 2012).

Un altro importante ruolo nell'EMT è svolto dal "silenziamento" epigenetico nella regolazione di determinati effettori. La metilazione dei siti promotori dei micro-RNA e dei membri della famiglia di Wnt svolge funzioni antagoniste, diminuendo la proliferazione cellulare, la trasformazione tumorale e l'invasività (Prasad *et al.*, 2008). La perdita di questo silenziamento epigenetico si è dimostrato sufficiente ad indurre l'EMT (Papageorgis *et al.*, 2010).

Un'altra importantissima influenza è rappresentata dallo stroma tissutale. Cellule stromali (fibroblasti, miofibroblasti, granulociti ecc.), matrice extracellulare, vasi sanguigni e linfatici sono indispensabili per la fisiologia del tumore. Il TGF- $\beta$  è forse la molecola più conosciuta ad essere implicata nel coordinamento e nell'interazione tra stroma e massa tumorale (Talbot *et al.*, 2012).

Infine, l'ambiente ipossico tumorale contribuisce alla propria reattività, alla propria natura infiammatoria e alla propria capacità di resistere alle radiazioni e alla chemioterapia. Lo stress ipossico, inoltre, promuove angiogenesi, linfangiogenesi e infiammazione, portando al reclutamento di molte molecole che possono potenziare l'azione di metastasi (Lindsay *et al.*, 2012).

Sulla base di quanto descritto in letteratura è stato proposto che l'induzione dell'EMT può essere riassunta in due principali modalità, entrambe fondamentali. I cambiamenti fisici e genetici cellulari sono, infatti, una condizione necessaria ma non sufficiente. Anche il microambiente tissutale appare indispensabile (Chaffer *et al.*, 2011).

### **1.3.3 Epithelial-Mesenchymal transition e Mesenchymal-Epithelial transition**

EMT generalmente non si sviluppa in modo omogeneo in tutta la massa tumorale, con qualche rara eccezione, come nel caso del carcinoma lobulare diffuso della donna, dove la E-caderina viene persa uniformemente da tutte le cellule neoplastiche, oppure nei carcinomi a cellule fusate che, come intuibile dal nome, esprimono un fenotipo fortemente mesenchimale (Turashvili *et al.*, 2007; Carter *et al.*, 2006).

Attraverso i giusti stimoli extracellulari, come ad esempio l'attivazione del *pathway* TGF- $\beta$  (tumor growth factor beta) e/o del *pathway* Wnt/ $\beta$ -catenina, associati all'espressione di determinati regolatori come Snail-Slug-Twist, Cripto 1 e Six1, le cellule a livello del margine invasivo del tumore acquisiscono la capacità di allontanarsi dalla massa primitiva, dando inizio alla metastasi (Micalizzi *et al.*, 2010).

È tuttavia fondamentale comprendere che l'EMT è condizione necessaria, ma non sufficiente, per la disseminazione tumorale. Due sono le considerazioni che ridimensionano quanto detto finora: la prima si basa sul fatto che sono le cellule non-EMT che si organizzano nel sito di destinazione; la seconda, invece, deriva dal fatto che molti lavori scientifici ritengono che tutta questa trasformazione possa spiegare come una singola cellula alla volta possa staccarsi dal tumore primitivo e migrare, ma evidenze cliniche dimostrano come spesso ci sia, invece, una migrazione collettiva, gruppi o colonne di cellule che vagano unite tra loro (Micalizzi *et al.*, 2010). Studi sul ratto, infatti, hanno dimostrato che inibendo la via di segnale del TGF- $\beta$  nel carcinoma mammario viene inibita la migrazione cellulare singola, ma non quella collettiva (Giampieri *et al.*, 2009).

Una nuova ipotesi sostiene che le cellule epiteliali e mesenchimali tendono a cooperare durante la migrazione e che non ci sia la prevalenza di una popolazione in particolare. Ciò concorda con il fatto che questa transizione non è omogenea all'interno della massa tumorale e che non rappresenta una trasformazione irreversibile. L'irreversibilità renderebbe impossibile ciò che avviene nel sito di metastasi, ovvero la Transizione Mesenchimale-Epiteliale (MET) (Tsuji *et al.*, 2009). L'osservazione di come cellule staminali nel sito di metastasi esibiscano un fenotipo epiteliale che mima la neoplasia di origine, ha portato a ritenere probabile un processo inverso all'EMT. Tuttavia, le vie di attivazione, le modalità e le tempistiche con cui questo avviene sono oggetto di dibattito (Gao *et al.*, 2008; Hugo *et al.*, 2007). L'idea parte da studi effettuati sull'organogenesi del rene. Durante la conversione del mesenchima metanefrico in epitelio, entra in azione un proteoglicano di matrice, denominato Versican. L'espressione di questo proteoglicano in cellule fibroblastiche comporta la loro conversione in cellule epiteliali (Sheng *et al.*, 2009). Dato che l'espressione del Versican avviene nello stroma, c'è la possibilità che le cellule tumorali disseminate possano indurre MET come conseguenza di condizioni microambientali locali che incontrano durante la metastasi, o più semplicemente, che il microambiente possa non rendere favorevoli i presupposti che hanno portato ad EMT (Sheng *et al.*, 2009).

## **1.4 YAP e TAZ**

### **1.4.1 Identificazione di YAP e TAZ**

YAP (Figura 1) fu isolata per la prima volta nel pollo. L'acronimo indica *Yes-associated protein 1* e possiede diversi distinti domini (Sudol *et al.*, 1994), mostrati in figura 2. Si presenta come due distinte isoforme: la più conosciuta e maggiormente espressa *Human Yap2* e una variante priva del secondo dominio WW denominata Yap1. La regolazione della maggior espressione di un'isoforma rispetto all'altra non è ancora ben conosciuta (Zhao *et al.*, 2008).

YAP è ubiquitariamente presente in quasi tutti i tessuti, esclusi i leucociti periferici (Komuro *et al.*, 2003) ed è espressa durante tutto sviluppo, dalla fase di blastocisti a quella perinatale (Morin-Kensicki *et al.*, 2006). La sua funzione rimase enigmatica fino a quando non se ne comprese il ruolo come co-attivatore di trascrizione, poiché interagiva con il motivo PPXY dei fattori di trascrizione RUNX1 e 2 attraverso i suoi domini WW (Yagi *et al.*, 1999). Successivamente si scoprì che YAP si lega

principalmente ad una famiglia di quattro omologhi fattori di trascrizione, denominati TEAD (Vassilev *et al.*, 2001).

TAZ (*Transcriptional co-Activator with pdZ-binding motif*) (Figura 1) conosciuto anche come WWTR1 (dominio WW contenente il regolatore di trascrizione 1) fu, invece, inizialmente scoperto nel 2000 come proteina legante 14-3-3, una famiglia di 7 proteine omologhe con la capacità di legare diverse molecole segnale coinvolte in diverse funzioni cellulari quali differenziazione, progressione del ciclo, e apoptosi (Kanai *et al.*, 2000). L'interazione con le proteine 14-3-3 è garantita dalla fosforilazione della Serina89. TAZ è omologa di YAP con il 46% di sequenza aminoacidica identica e presenta una distribuzione dei domini simili, con, tuttavia, un solo un dominio WW (Hong e Guan, 2012) (Figura 1 e 2).

Ad oggi l'NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) indica che il gene TAZ può essere trascritto in 3 varianti (Hong e Guan, 2012).

Biochimicamente, TAZ ha dimostrato un'azione di co-attivatore trascrizionale attraverso l'interazione con fattori di trascrizione PPxY grazie al suo dominio WW. La regione C-terminale di quest'ultimo (aminoacidi 165-395) è responsabile di tale attività (Kanai *et al.*, 2000).

Yki (Figura 1) rappresenta l'omologo di TAZ e YAP nella *Drosophila*, identificata come bersaglio della cascata di Hippo da Huang e colleghi (2005). La sua individuazione e la dimostrazione dell'omologia con YAP/TAZ permisero di ipotizzare che anche YAP/TAZ rappresentassero dei bersagli della cascata di Hippo (Hong e Guan, 2012).

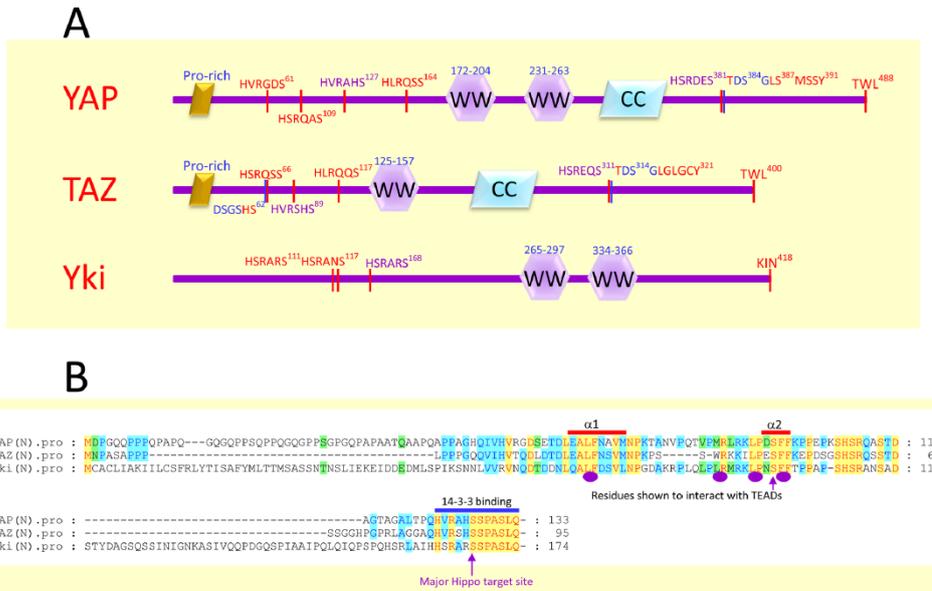


Figura 1 Organizzazione del dominio di YAP e TAZ. Disegno schematico di YAP, TAZ e Yki. (A) I motivi HXRXXX bersaglio di Hippo sono indicati in viola. (B) Residui identici in tutte e tre le proteine sono indicati in rosso con fondo giallo(B). Gli ovali viola sono i residui coinvolti nell'interazione con TEADs. Da Wanjin Hong e Kun-Liang Guan, 2012.

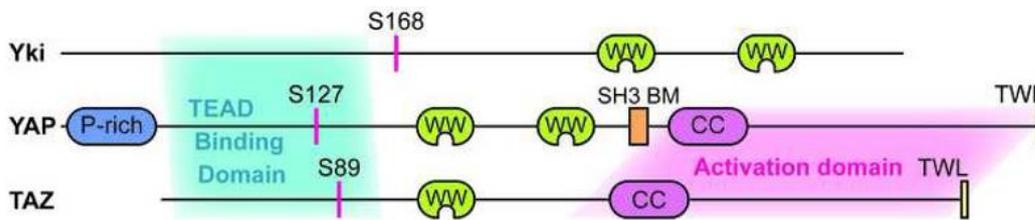


Figura 2 Rappresentazione schematica dei principali domini di YAP, TAZ e YKI. Da Zhao et al., 2008.

## 1.4.2 Regolazione e Regolatori di YAP, TAZ e Hippo

### 1.4.2.1 Hippo

La via di Hippo promuove la morte cellulare, impedisce la differenziazione e la proliferazione. Fu scoperta per la prima volta nel moscerino della frutta *Drosophila* durante uno studio sui geni oncosoppressori. L'inattivazione, infatti, di Warts (Wts), Hippo (Hpo), Salvador (Sav) e Mats comportava una sovra-crescita neoplastica (Yu Fa-Xing e Guan Kun-Liang, 2013).

Hippo è presente anche nei mammiferi: MST1 e 2 (ortologi di Hpo), Sav1, Lats1 e 2 (ortologi di Wts) e Mob1 (MOBKL1A e MOBKL1B, ortologi di Mats) formano una cascata chinasi che fosforila YAP/TAZ (ortologi di Yki), inattivandoli (Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013). MST1/2 sono proteine chinasiche e possono fosforilare Sav1, Lats1/2 e Mob1 (Figura 3). L'attività chinasi di MST1/2 viene rinforzata

attraverso l'interazione con Sav1, mediata dal dominio SARAH presente in entrambi (Callus *et al.*, 2006). MST1/2 fosforilano direttamente Lats1/2 a livello del loro motivo idrofobico, attivandoli (Chan *et al.*, 2005). Mob1, dopo essere stato fosforilato anch'esso da MST1/2 si lega al motivo di auto-inibizione di Lats1/2, comportando una nuova fosforilazione e il loro incremento di attività chinasi (Yu Fa-Xing e Guan Kun-Liang, 2013) (Figura 3). Callus e colleghi (2006) hanno dimostrato che Sav può fungere da ponte per tenere legati MST1/2 e Lats1/2 e può aumentare o inibire l'attività di Lats1/2 al momento della fosforilazione da parte di MST1/2. Si presume, comunque, che la fosforilazione di Lats1/2 cambi nelle varie cellule, dato che, in topi knockout per quanto riguarda MST1/2 nel fegato, non ne viene alterata la cascata fosforilativa e quindi l'attivazione (Zhou *et al.*, 2009). Lats1 e 2 fosforilano direttamente YAP/TAZ e questa interazione può essere mediata dai motivi PPxY dei primi e i domini WW dei secondi (Hao *et al.*, 2008) (Figura 3).

Normalmente la forma fosforilata di YAP/TAZ ne comporta il sequestro a livello del citoplasma attraverso l'interazione con proteine 14-3-3 (Zhao *et al.*, 2007); l'inibizione di questa cascata comporta ipofosforilazione di YAP/TAZ e una loro conseguente traslocazione all'interno del nucleo (Yu Fa-Xing e Guan Kun-Liang, 2013). Si è visto, inoltre, come lo stato fosforilato di YAP/TAZ influenzi la loro stabilità proteica poiché comporta l'attivazione di una serie di eventi che attuano processi fosforilativi da parte della Casein Chinasi1 (CK1 $\delta/\epsilon$ ) che recluta  $\beta$ -TRCP ( *$\beta$ -transducing repeat-containing proteins*) e degradano YAP/TAZ (Zhao *et al.*, 2010).

YAP/TAZ, attivati, hanno come bersaglio dei fattori di trascrizione come TEAD1-4 che regolano geni implicati nella proliferazione cellulare e nell'apoptosi (Zhao *et al.*, 2008) (Figura 3). Le interazioni e le influenze tra le varie componenti di Hippo richiedono, tuttavia, studi più approfonditi. Molti autori hanno dimostrato, infatti, come YAP/TAZ possano interagire con una vera e propria moltitudine di fattori di trascrizione quali Smad1, Smad 2/3, Smad7, RUNX1/2, p63/p73, ErbB4 solo per citarne alcuni. Le conseguenze di queste interazioni nella regolazione degli stessi YAP/TAZ e di Hippo non sono ancora totalmente conosciute (Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013).

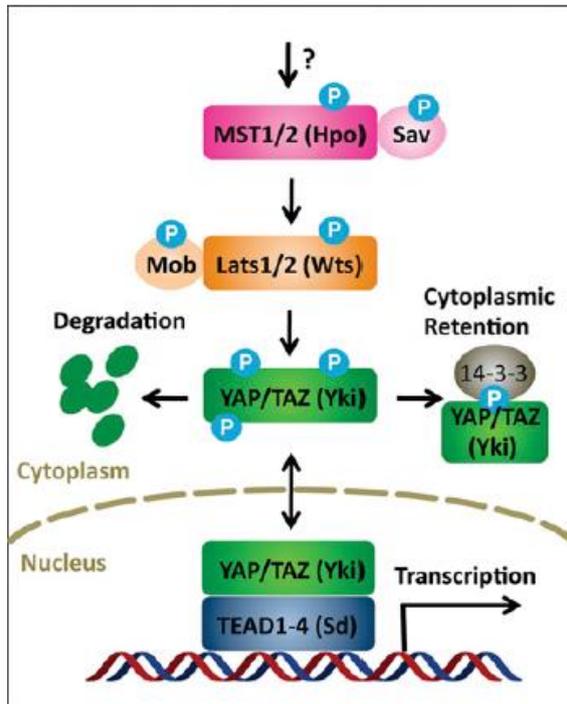


Figura 3 Il cuore della via di segnale di Hippo. MST1/2 fosforila Sav, Lats1/2 e Mob; lats1/2 fosforila YAP/TAZ che a loro volta interagiscono con le proteine 14-3-3 comportando la propria ritenzione citoplasmatica. Quando de-fosforilati entrano nel nucleo legandosi a TEAD 1-4. Da Yu Fa-Xing e Guan Kun-Liang, 2013.

#### 1.4.2.2 Le implicazioni di YAP e TAZ nella polarità apico-basale

Normalmente le cellule epiteliali sono legate l'un l'altra attraverso giunzioni aderenti, desmosomi e giunzioni strette. Queste, insieme a complessi apico-basali, contribuiscono a mantenere una certa polarità. È interessante notare come molti regolatori a monte di Hippo siano componenti di queste strutture (Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013) (Figura 4).

Mer (Merlin) ed Ex (Expanded) hanno funzioni oncosoppressive e giocano un ruolo importante nella proliferazione e nella differenziazione cellulare. Kibra interagisce con queste due. Tutte e tre si localizzano a livello del dominio apicale delle cellule (Yu *et al.*, 2010) (Figura 4). Mer ed Ex sono considerate il legame tra la membrana apicale e il citoscheletro (Bretscher *et al.*, 2002). Sav ed MST1/2 si associano a Mer ed Ex, mentre kibra interagisce con Lats1/2 rendendo chiaro che il complesso Mer/Ex/Kibra possa reclutare la cascata di Hippo a livello di membrana per attivarla (Yu *et al.*, 2010) (Figura 4). Crb, una proteina trans-membrana, può interagire con Ex donandogli stabilità e indirettamente mantenendo attivata Hippo (Ling *et al.*, 2010).

Similmente anche il complesso apicale PAR interagisce con Hippo. L'espressione elevata di aPKC, una delle sue componenti, può indurre YAP/TAZ (Grzeschik *et al.*,

2010; Sun *et al.*, 2011) (Figura 4). Normalmente l'attività di questo complesso è antagonizzata dal complesso basale Scrib (Scribble). Un problema a questo livello comporta indirettamente l'attivazione di YAP/TAZ (Martin-Belmonte *et al.*, 2012).

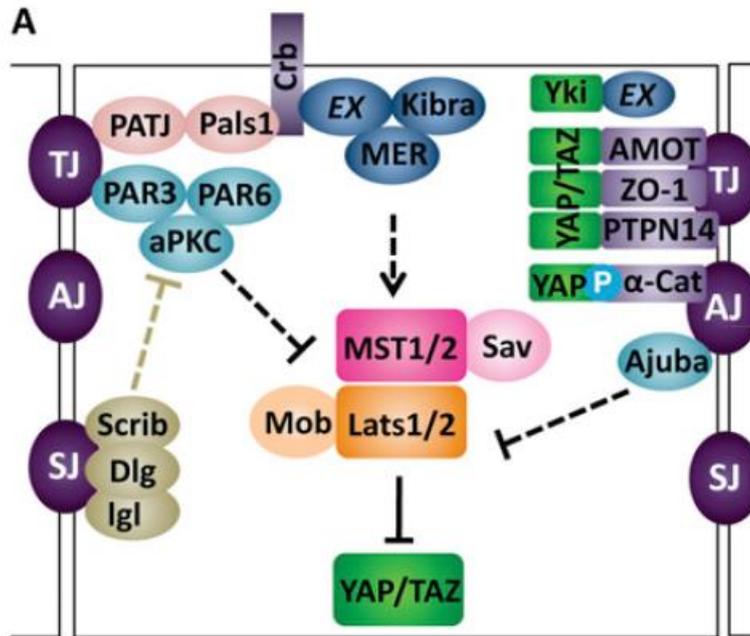


Figura 4 Regolazione di Hippo da parte delle componenti implicata nella polarità apico-basale cellulare. Da Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013.

Ci sono poi regolatori che innescano YAP/TAZ direttamente come le angiomotine (AMOT), che normalmente dovrebbero contribuire all'integrità delle giunzioni strette (da qui in poi denominate anche Tj) (Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013) (Figura 4). Zhao e colleghi (2007), come anche altri autori indipendenti l'uno dall'altro, hanno dimostrato che in questo caso l'azione su TAZ non dipende dalla presente o assente fosforilazione di quest'ultimo, ma è mediata tramite il legame del motivo PPxY di AMOT con il WW di TAZ, risultando in una sua impossibilità di traslocare a livello nucleare e rimanendo agganciato alla membrana cellulare. Sempre Zhao e colleghi (2007) hanno dimostrato come le angiomotine possano avere azione di *scaffolding* su MST1/2 e Lats1/2.

A-catenina è un altro componente delle giunzioni aderenti (da qui in poi denominate anche Aj) che funziona da legante per le caderine di membrana e l'actina del citoscheletro. Contrariamente ad AMOT però, YAP/TAZ devono essere già fosforilati perché l'A-catenina riesca a legarsi a loro risultando in un raggruppamento che ne favorisce il sequestro (Schlegelmilch *et al.*, 2011). La PTPN14 (*protein tyrosine*

*phosphatase 14*) può legarsi a YAP/TAZ similmente ad AMOT. Concludendo, moltissime altre proteine interagiscono con Hippo modulando l'azione di YAP/TAZ (Figura 4).

Tutto questo rende l'idea di come il contatto tra cellule, l'integrità delle giunzioni e la polarità apico-basale siano importanti regolatori direttamente o indirettamente di Hippo e YAP/TAZ, impedendone la cascata o contribuendo a mantenerli lontani dal nucleo dove svolgono la loro reale funzione. La distruzione delle giunzioni cellulari, ad opera di meccanismi che regolano l'EMT, instaura, quindi, delle reazioni enzimatiche a cascata (Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013).

#### ***1.4.2.3 Le interazioni di YAP e TAZ, Hippo con i recettori accoppiati a proteine G***

Si è scoperto che un gran numero di fattori di crescita regolano la proliferazione cellulare attraverso l'utilizzo di molecole segnale che si legano a determinati recettori di membrana, innescando una cascata enzimatica intra-cellulare. Due gruppi indipendenti di autori si sono accorti di come il siero possa attivare YAP/TAZ in culture cellulari e dopo aver effettuato degli studi, sono state isolate due componenti chiamate LPA, o acido lisofosfatidico, e S1P, o sfingosina-1-fosfato (Miller *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012). Poco dopo, sempre gli stessi autori, hanno dimostrato come YAP/TAZ possano essere regolati tramite diversi recettori accoppiati a proteine G (da qui in poi chiamate GPCRs). Il passaggio successivo è stato accomunare queste scoperte, dimostrando che LPA e S1P attivano YAP/TAZ legandosi a rispettivi GPCRs sulla superficie cellulare e comportando l'attivazione di proteine G etero-trimeriche più a valle (Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013). La Rho GTPasi e il rimodellamento dell'actina rappresentano dei veri e propri effettori di questa via, rendendo chiaro, quindi, come lo stress meccanico e fattori solubili convergano rimodellando l'actina del citoscheletro (Figura 5). Si ritiene che Lats1/2 siano gli effettori a valle di questo meccanismo anche se non è da escludere una maggiore complessità (Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013).

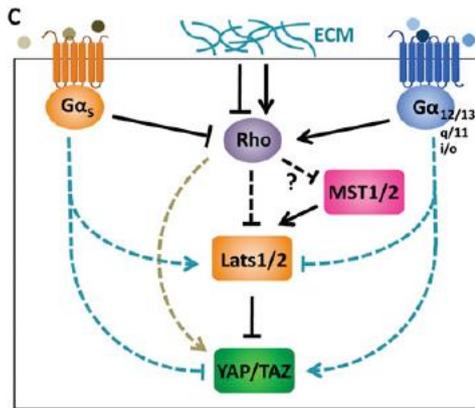


Figura 5 La regolazione di YAP/TAZ attraverso GPCRs. Da Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013.

Curiosamente questa cascata può essere influenzata da diverse molecole che agiscono sui recettori descritti. Le più importanti tra le molecole scoperte sono l'epinefrina, la trombina, il glucagone e la dopamina, le quali possono indurre la fosforilazione di YAP/TAZ, impedendone la funzione. La dobutamina, invece, sembra essere dotata di particolare affinità solo verso YAP (Bao *et al.*, 2011)

I GPCRs sono una grandissima famiglia di recettori superficiali che mediano risposte ad un ampissimo numero di molecole. Una loro anomala funzione è implicata nello sviluppo del tumore. Ad esempio, nei tumori mammari maligni di elevato grado, è stata notata un'elevata espressione di PAR1, una tipologia di recettore (Hernandez *et al.*, 2009). Appare evidente, dunque, l'importanza dell'interazione tra questi e TAZ. Nei prossimi anni sarà fondamentale cercare di ottenere una maggiore comprensione del ruolo di questi meccanismi (Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013).

#### 1.4.2.4 Matrice extracellulare, citoscheletro e YAP e TAZ

In vivo le cellule subiscono continui segnali meccanici da parte delle loro vicine, della matrice extracellulare e dei fluidi circostanti. Anche la forma e la geometria cellulare e del tessuto influisce. Risulta, quindi, indispensabile rimarcare il fatto che questi stimoli possono essere percepiti e trasdotti in particolari cascate enzimatiche che portano alla proliferazione, all'apoptosi, alla differenziazione e alla metastasi. Il citoscheletro cellulare, infatti, funziona da convertitore di questi segnali (Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013).

La biomeccanica è attualmente riconosciuta da molti come un fattore di regolazione importantissimo, sia nel normale sviluppo sia nella patologia cellulare. Molte neoplasie,

ad esempio, mostrano un aumento della durezza tissutale a causa dell'alterata composizione della matrice extracellulare (Levental *et al.*, 2009). Contrariamente, la lassità di matrice rallenta la crescita tumorale (Levental *et al.*, 2009). In figura 6 sono riassunte le principali forze biomeccaniche implicate nella regolazione di YAP/TAZ. Si sa, inoltre, che la durezza tissutale agisce da fattore determinante per la differenziazione delle cellule staminali, portando verso lo sviluppo di osteoblasti in caso di rigidità e di adipociti in caso di lassità (Engler *et al.*, 2006). Non a caso è stato scoperto, poi, che TAZ può promuovere l'osteogenesi a discapito dell'adipogenesi (Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013).

I filamenti di actina sono stati presi in considerazione come importanti regolatori della proliferazione cellulare (Provenzano *et al.*, 2011) e i microtubuli per la divisione (Sorger *et al.*, 1997). Tre recenti studi hanno dimostrato come YAP/TAZ sono regolati da stimoli meccanici. La geometria cellulare secondo questi autori inibisce YAP/TAZ. La durezza della matrice extracellulare li attiva nelle cellule in prossimità (mentre nei tessuti molli vengono inibiti). L'allontanamento delle cellule e quindi lo smembramento di un tessuto li attiva, mentre il ricongiungersi di cellule li inibisce (Dupont *et al.*, 2011; Wada *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012). Tutti e tre gli studi rivelano, quindi, che il citoscheletro reagisce modificando l'attività di YAP/TAZ. Dupont e colleghi (2011) hanno inoltre riportato che l'actina e la miosina, proteine con attività contrattile presenti soprattutto nei muscoli, sono presenti in fasci anche nelle cellule non muscolari, dove possono generare l'attivazione di RhoA contraendosi. Quest'ultimo attiva YAP/TAZ.

Uno studio recente identifica nelle proteine *F-actin-capping/severing* quali Cofilin, CapZ e Gelsolin la capacità di limitare l'attività di YAP/TAZ in cellule sottoposte a scarso stress meccanico e quando vi è inibizione della proliferazione per contatto; contrariamente, in aree soggette a maggiore sollecitazione si nota che la perdita di CapZ e di Cofilin dimostra effetti marginali (Aragona *et al.*, 2013). L'inattivazione di queste proteine è accompagnata dalla ricomparsa delle fibre da stress di F-actina, la cui espressione normalmente è inibita inibendo miosina e formina. Non è però esclusa, da questi autori, la possibilità che le proteine *capping/severing* agiscano anche in modo differente, ad esempio contribuendo alla modificazione del microambiente e della composizione della matrice extracellulare (Aragona *et al.*, 2013). Sempre gli stessi autori propongono una seconda spiegazione per chiarire l'inibizione da contatto. Ritengono, infatti, che l'innescò del sistema Lats da parte delle E-caderine/catenine durante l'adesione cellulare sia insufficiente come fattore d'inibizione della

proliferazione, ma nel momento in cui questa continua, il “sovraccollamento” causa una riduzione della massa cellulare e un minore stress meccanico, con il conseguente blocco della proliferazione. Si evince, da ciò, che la regolazione meccanica non solo è quasi totalmente indipendente dalla fosforilazione di YAP/TAZ da parte di Hippo, ma è in grado di dominarla (Aragona *et al.*, 2013). Non a caso, una mutazione in questa via non altera indiscriminatamente tutte le cellule, anche se naturalmente può essere concausa di quella serie di eventi che determinano stress meccanici (Aragona *et al.*, 2013). L’importanza biologica di questa regolazione è stata recentemente dimostrata proprio nel tumore mammario, dotato di notevole rigidità rispetto al tessuto sano a causa dell’eccessiva deposizione di collagene da parte delle cellule stromali. Curiosamente è stato notato che YAP può essere attivato da fibroblasti associati al tumore (*cancer-associated fibroblasts* o CAFs) ed è indispensabile per l’indurimento della matrice che, a sua volta, favorisce l’attività di YAP, costituendo un importante *feedback* positivo (Calvo *et al.*, 2013). Stranamente, finora, solo per YAP è stata dimostrata quest’ultima capacità, mentre solo per TAZ è stata dimostrata la capacità di far progredire il tumore, a significare che la comprensione d’insieme di questi meccanismi è ancora lontana dall’essere raggiunta (Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013).

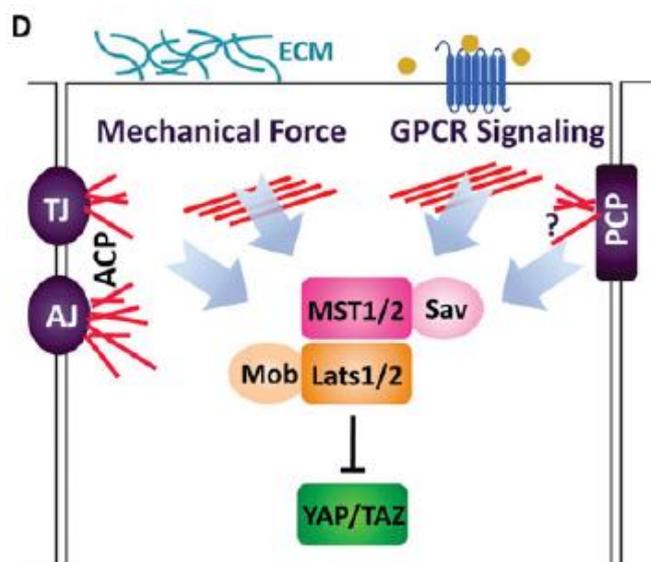


Figura 6 Matrice extracellulare, citoscheletro e altri fattori meccanici che influenzano Hippo, YAP e TAZ. Da Fa-Xing Yu e Kun-Liang Guan, 2013.

### 1.4.3 YAP e TAZ nella biologia tumorale

Le caratteristiche di un tumore comprendono 6 funzioni biologiche acquisite durante la sua fase di sviluppo: (i) sostenere la proliferazione, (ii) eludere la soppressione della crescita, (iii) resistere all'apoptosi, (iv) consentire l'immortalità replicativa, (v) indurre l'angiogenesi e (vi) attivare l'invasione o metastasi (Piccolo *et al.*, 2013).

Alla base di tutto questo si può identificare l'instabilità del genoma (che genera la diversità genetica che ne accelera l'acquisizione), l'infiammazione (che promuove molteplici funzioni), la riprogrammazione del metabolismo energetico e l'elusione dell'immunità (Piccolo *et al.*, 2013). Oltre a ciò le neoplasie contengono anche cellule normali che contribuiscono fornendo un microambiente tumorale, rendendo sempre più complessa la comprensione dell'insieme (Hanahan *et al.*, 2011). Le cellule neoplastiche, infatti, necessitano di interazioni "sociali" tra loro e ciò è dimostrato dal fatto che non sono sufficienti mutazioni al DNA per comportare uno sviluppo tumorale. Anche fattori microambientali svolgono azioni promotrici della crescita, dello sviluppo e della conformazione della massa neoplastica (Piccolo *et al.*, 2013). Tumori come quello mammario non sono semplici cloni di cellule cancerogene, ma veri e propri "organi anomali" composti da molte tipologie cellulari e matrice extracellulare (Egeblad *et al.*, 2010). Oltre ad ossigeno, nutrienti e fattori di crescita, l'ambiente fornisce gli ingredienti per la strutturazione tridimensionale della matrice, l'organizzazione della polarità e delle giunzioni e la resistenza del citoscheletro a forze di tensione e compressione, contribuendo alla forma del tessuto, come avviene normalmente negli organi sani; in questi il micro-ambiente funge da potente oncosoppressore (Butcher *et al.*, 2009; Discher *et al.*, 2009; Mammoto *et al.*, 2009; Halder *et al.*, 2012).

Anche se la crescita di un tessuto può essere imputata all'ingrandimento cellulare e all'accumulo di matrice, le dimensioni del tessuto sono date dal numero effettivo di cellule in esso presenti. Sembra, quindi, che l'organo sappia quale sarà il suo sviluppo finale, inducendo uno stop nella divisione cellulare, spesso indipendentemente dal grado di sviluppo dell'intero organismo (Piccolo *et al.*, 2013).

Negli ultimi anni, la scoperta di Hippo ha permesso di comprendere meglio la biologia di questi fenomeni. La via di segnale di Hippo costituisce un regolatore intrinseco della grandezza d'organo, essenziale per fermarne l'incremento quando questo raggiunge il giusto grado di sviluppo; l'inibizione di questa via comporta l'espressione massiva di due suoi correlati modulatori di fattori di trascrizione, YAP e TAZ, e il loro accumulo all'interno del nucleo, portando ad una crescita anomala

dell'organo stesso (Piccolo *et al.*, 2013). L'induzione continua di YAP nel fegato di topo, ne comporta un sorprendente aumento di quattro volte la normale misura (Dong *et al.*, 2007). È degno di nota che questo incremento è reversibile, non appena l'organo percepisce quanto accaduto, YAP viene inibito, e torna alle dimensioni normali (Piccolo *et al.*, 2013).

Sebbene molto simili a livello funzionale, tuttavia, YAP/TAZ possiedono caratteristiche proprie: ad esempio il *knockdown* di YAP comporta morte embrionale nel topo a circa 8 giorni e mezzo di gestazione, l'accorciamento dell'asse corporeo e difetti nella genesi vascolare e del sacco vitellino (Morin-Kensicki *et al.*, 2006); topi *knockout* per TAZ, invece, dimostrano alterazioni renali (rene policistico), sviluppo di enfisema polmonare, difetti cardiaci e vascolari (Dupont *et al.*, 2011). Inoltre, in molti casi, il knockdown di una delle due molecole non viene compensato dall'attività vicariante dell'altra, spingendo a supporre una diversa regolazione spaziale o temporale di queste due oppure diversi *target* più a valle (Piccolo *et al.*, 2013). Nell'uomo e nel topo TAZ appare espresso in quasi tutti i tessuti (soprattutto nel rene), eccetto il timo e i leucociti del sangue periferico (Kanai *et al.*, 2000), mentre YAP è ubiquitariamente presente, esclusi solamente i leucociti periferici (Komuro *et al.*, 2003). Non sorprende, dunque, come la via di segnale di Hippo non intervenga solo in un gruppo ristretto di tessuti; una sua anomalia può portare a cardiomegalia per aumento della proliferazione dei cardiomiociti, oppure può promuovere l'espansione dei progenitori neuronali nel sistema nervoso centrale (Cao *et al.*, 2008; Heallen *et al.*, 2011).

Negli ultimi anni sono state scoperte diverse variazioni della cascata enzimatica di Hippo, come la fosforilazione di YAP/TAZ indipendentemente da Lats1/2, l'attivazione indipendente da MST1/2 di Lats1/2 e la fosforilazione diretta di YAP/TAZ totalmente indipendente da Hippo (Zhou *et al.*, 2009; Dupont *et al.*, 2011; Schlegelmilch *et al.*, 2011; Moleirinho *et al.*, 2013). Queste evidenze hanno comportato una diminuzione dell'importanza che sembrava avere Hippo nella regolazione dello sviluppo di un organo, obbligando a considerare anche regolazioni non "canoniche" di YAP/TAZ. Ad esempio, una inibizione a livello cutaneo delle MST1/2 non produce alterazioni significative, mentre, l'iper-espressione di YAP causa iperplasia e ispessimento (Schlegelmilch *et al.*, 2011).

Come YAP/TAZ a livello nucleare controllino la crescita rimane poco chiaro e sembrerebbe non esistere un vero e proprio programma universale di espressione genica. Diversi tessuti, infatti, potrebbero indurre la trascrizione di diversi geni coinvolti

nella proliferazione cellulare (Piccolo *et al.*, 2013). Alcuni autori ritengono che le cellule vengano riprogrammate geneticamente per impedire la differenziazione finale, in favore di un potenziale proliferativo maggiore. Le caratteristiche risultanti da questa riprogrammazione possono essere poi sfruttate in presenza di altri regolatori di crescita intrinseci ed estrinseci (Piccolo *et al.*, 2013).

La rigenerazione tissutale, che sia imposta in laboratorio o che sia un semplice processo omeostatico, implica che le cellule siano costantemente informate e “consapevoli” della grandezza dell’intero organo e quindi di ciò che accade molto distante da loro, senza contare che la forma di quest’ultimo viene forgiata con estrema accuratezza, forse troppa per essere una semplice conseguenza di fattori di crescita o morfogeni. Discher e colleghi (2009) ritengono, infatti, che vi siano anche segnali meccanici che, tramite stiramento, compressione e rimodellamento della matrice extracellulare, influenzino questo comportamento. Stimoli meccanici, infatti, potrebbero ripercuotersi anche nelle aree più distali di un determinato tessuto, propagandosi come un’onda d’urto che sfrutta la flessibilità del citoscheletro cellulare (Jamney *et al.*, 2011). Le cellule staminali residenti in determinate nicchie, sarebbero le più sensibili a questo tipo di sollecitazione (Piccolo *et al.*, 2013). Ciò è confermato dalla scoperta che YAP/TAZ possono essere modulati proprio attraverso stimoli meccanici (Dupont *et al.*, 2011). Secondo Dupont e colleghi (2011) una matrice rigida, una cellula di forma fusata e un citoscheletro di actina in tensione, sono tutti potenti induttori per la localizzazione nucleare di YAP/TAZ e rendono quest’ultimi non più semplici meccano-trasduttori ma dei veri e propri mediatori chiave nella formazione e nella strutturazione di un organo complesso. Per esempio, le cellule endoteliali muoiono quando “costrette” a rimanere piccole, mentre proliferano in caso di ordine opposto (Chen *et al.*, 1997). Le quantità di YAP/TAZ dettano questi comportamenti antitetici: quando YAP o TAZ sono sovra-espressi in piccole cellule, queste iniziano a proliferare, mentre l’attenuazione di YAP/TAZ ne obbliga l’apoptosi. Queste regolazioni di YAP/TAZ sono indipendenti da Hippo (Piccolo *et al.*, 2013). Gli scenari sembrano, quindi, essere due. Nel primo, la stabilizzazione della proteina TAZ è un fattore fondamentale per EMT nel tumore mammario, non indispensabile per l’espressione di fenotipi mesenchimali, ma per l’autorinnovamento, la ridotta differenziazione e la genesi del tumore (Cordenonsi *et al.*, 2011). EMT, infatti, è intrinsecamente legata alla traslocazione del determinante di polarità cellulare SCRIBBLE, inibendone la funzione di adattatore per le chinasi di Hippo sulla membrana cellulare, che comporterebbe la fosforilazione di TAZ e la

conseguente degradazione. Nel secondo, YAP e TAZ vengono attivati da cascate enzimatiche diverse da Hippo, come suggeriscono anche altri dati recenti secondo cui la stabilità di TAZ è sotto il controllo dello stesso complesso di distruzione (composto da APC, Axina, GSK3) che controlla la  $\beta$ -catenina (Piccolo *et al.*, 2013). L'inibizione di questo complesso tramite i fattori di crescita come Wnt o direttamente tramite l'inattivazione di APC innesca la stabilizzazione di TAZ (Azzolin *et al.*, 2012), che a sua volta, può mediare l'attivazione di una consistente porzione dei *target* di Wnt (vedi paragrafo relativo).

#### **1.4.3.1 Il conferimento di proprietà staminali al tumore mammario da parte di TAZ**

Un importantissimo studio di Cordenonsi e colleghi (2011) ha dimostrato che TAZ rappresenta un determinante molecolare per conferire proprietà biologiche staminali al tumore al seno della donna, quali l'autorinnovamento e la capacità di iniziazione tumorale. Il suo aumento di attività è sufficiente a convertire a livello sperimentale un tumore benigno in maligno di grado III. Sempre gli stessi autori hanno notato che TAZ viene attivato dagli stessi geni che regolano la transizione epiteliale-mesenchimale quali TWIST e SNAIL, mentre altri hanno scoperto che esso stesso induce l'EMT (Chan *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2008). In ogni caso, l'acquisizione di caratteristiche mesenchimali può essere indipendente da TAZ e forse potrebbe rappresentare un semplice meccanismo di autosostentamento per la propria continua espressione. È importante notare che, né l'intera stabilizzazione di TAZ, né l'autorinnovamento, richiedono l'attivazione dell'intero programma di EMT. Infatti, è sufficiente la perdita o la delocalizzazione del determinante di polarità cellulare Scribble e, curiosamente, quest'ultimo si presenta sempre delocalizzato rispetto alla membrana cellulare nei tumori mammari (Zhan *et al.*, 2008).

#### **1.4.4 Il legame tra YAP, TAZ e la Wnt/ $\beta$ -catenina**

Il sequenziamento del genoma ha rivelato che nei mammiferi esistono all'incirca 20 proteine Wnt suddivisibili in 12 sottofamiglie; curiosamente solo 6 di queste possiedono un corrispettivo negli ecdysozoi come *Drosophila*, ma almeno 11 compaiono nel genoma dei cnidari (tra i quali l'anemone di mare è uno dei più conosciuti) (Kusserow *et al.*, 2005). Questo suggerisce non tanto che le sottofamiglie di proteine Wnt siano state perse nell'evoluzione, quanto che esse siano state presenti negli

organismi multicellulari ben prima del Cambriano, ovvero 550 milioni di anni fa, rappresentando un importantissimo meccanismo del mondo animale (Kusserow *et al.*, 2005).

Il *pathway* canonico del sistema Wnt/ $\beta$ -catenina gioca un ruolo cruciale nel regolare il delicato equilibrio tra staminali e differenziazione nelle nicchie di cellule staminali di molti tessuti, quali la cute, la ghiandola mammaria e le cripte intestinali; interviene, inoltre, nella proliferazione cellulare, nella formazione degli organi in fase embrionale, nell'omeostasi tissutale e, se costitutivamente attivo a causa di una qualche mutazione, è alla base della formazione del tumore (Fodde e Thomas, 2007).

Le Wnt si legano in modo promiscuo a delle proteine Frizzled (Fz), dei recettori la cui struttura emula una serpentina che attraversa 7 volte la membrana plasmatica, cooperando con un'altra proteina trans-membrana della famiglia delle LRP (*low-density lipoprotein receptor-related proteins*) (Fodde e Thomas, 2007) (Figura 7). In assenza di questo legame, i livelli intracellulari di  $\beta$ -catenina sono regolati tramite la fosforilazione da parte di un complesso di distruzione comprendente le chinasi GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinasi-3 $\beta$* ) e CK1 (*casein kinase 1*), le proteine APC (*adenomatous polyposis coli*), le conductine Axina 1 e 2. È proprio tramite questo complesso che la  $\beta$ -catenina viene riconosciuta e sottoposta a ubiquitinazione da parte di una proteina con dominio F-box, ovvero la  $\beta$ -TrCP, la stessa nominata precedentemente per TAZ (Fodde e Thomas, 2007) (Figura 7). L'attivazione del recettore Fz comporta l'inibizione di questo complesso attraverso il sequestro di GSK3 $\beta$  in compartimenti multi-vescicolari e l'attivazione della  $\beta$ -catenina, la quale si libera e si porta nel nucleo dove si lega ad una famiglia di fattori di trascrizione TCF/LEF, comportando l'espressione di un ampio numero di geni (Fodde *et al.*, 2001) (Figura 7).

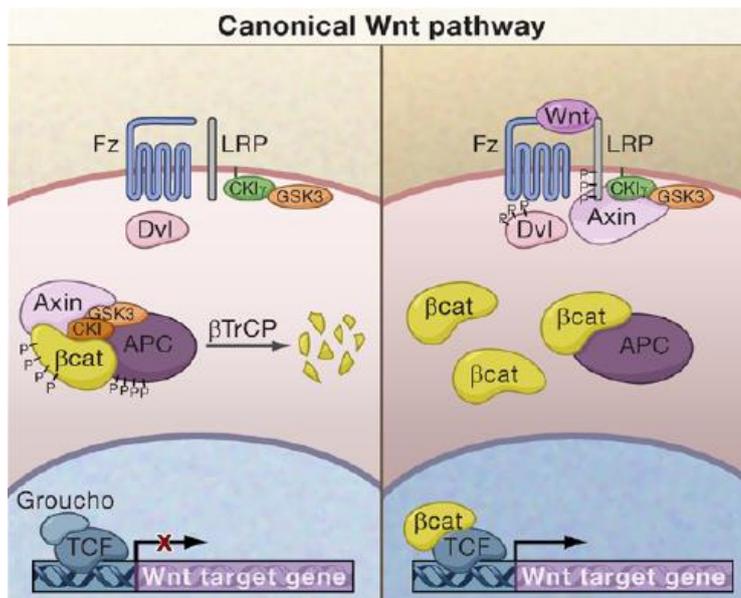


Figura 7 La via di attivazione della  $\beta$ -catenina. Da Hans Clevers, 2006.

YAP/TAZ sono effettori e modulatori del *pathway* di Wnt (Figura 8). È stato recentemente scoperto che la stimolazione delle Wnt porta alla stabilizzazione non solo della  $\beta$ -catenina ma anche di TAZ; non sembra, tuttavia, portare alla stabilizzazione della proteina YAP (Azzolin *et al.*, 2011). Secondo Azzolin e colleghi (2011), in assenza di stimolazione di Fz, la  $\beta$ -catenina fosforilata sarebbe in grado di legare TAZ e di conseguenza rendere anch'esso riconoscibile e soggetto a ubiquitinazione da parte di  $\beta$ -TrCP (Varela *et al.*, 2010). Taz, a sua volta, è in grado di influenzare negativamente Dishevelled, un regolatore importante nell'attivazione del sistema Wnt, creando una sorta di feedback negativo ai propri livelli di stabilità citoplasmatica (Varela *et al.*, 2010) (Figura 8).

È interessante notare che il profilo di espressione genica di cellule epiteliali mammarie con knockdown della  $\beta$ -catenina ha rivelato che il 74% dei geni *target* di quest'ultima sono anche dipendenti da TAZ (Azzolin *et al.*, 2012). Studi recenti suggeriscono un ruolo all'interno del nucleo da parte di YAP/TAZ nella modulazione della regolazione di espressione genica e negli effetti biologici di Wnt/ $\beta$ -catenina. Comunque, YAP/TAZ sembrano regolare Wnt/ $\beta$ -catenina anche attraverso meccanismi citoplasmatici (Azzolin *et al.*, 2012).

In colture cellulari è stato trovato che la sovra-espressione di YAP/TAZ inibisce l'attività della  $\beta$ -catenina su TCF4, mentre una sotto-espressione la favorisce (Imajo *et al.*, 2012; Varelas *et al.*, 2010). È stato poi dimostrato che a livello citoplasmatico

YAP/TAZ sono le forze principali di inibizione della  $\beta$ -catenina e, secondo gli autori precedentemente citati, YAP agirebbe come inibitore diretto, mentre TAZ agirebbe in modo indiretto sequestrando Dishvelled, rendendo evidente la duttilità d'azione di queste molecole all'interno della cellula (Imajo *et al.*, 2012; Varelas *et al.*, 2010). Si può, quindi, affermare che Hippo inibisce la cascata enzimatica di Wnt attraverso due meccanismi: il primo, attraverso la repressione di YAP/TAZ/ $\beta$ -catenina all'interno del nucleo, il secondo, promuovendo la ritenzione e la degradazione citoplasmatica di quest'ultima (Imajo *et al.*, 2012; Varelas *et al.*, 2010).

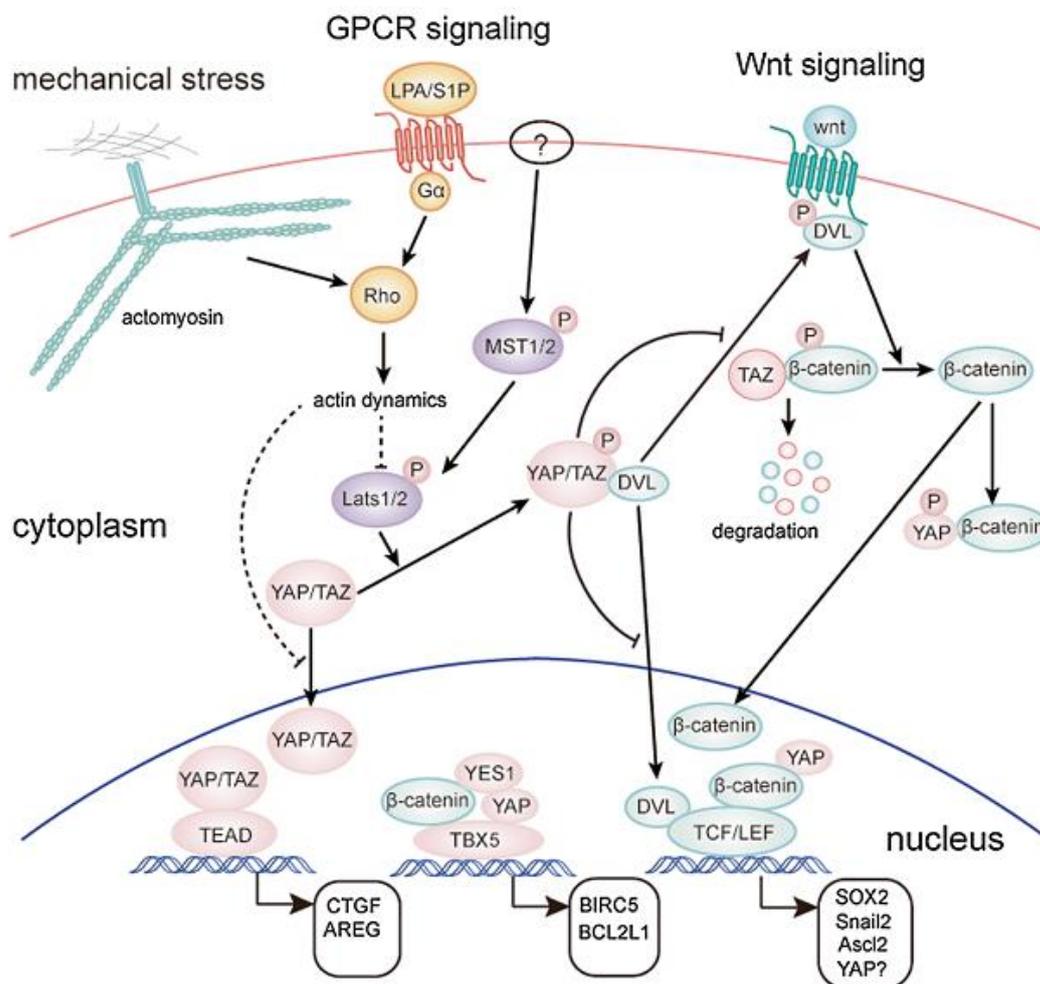


Figura 8 YAP/TAZ sono effettori influenzati dallo stress meccanico, dalle vie di segnale associate a proteine G e della cascata enzimatica associata a Wnt. Da Xiaocan Guo e Bin Zhao, 2013.

#### 1.4.5 YAP e TAZ nella terapia tumorale

Le possibilità di intervenire a livello terapeutico su YAP/TAZ sembrano essere molte. Si può colpire direttamente YAP/TAZ, avendo, infatti, come effettori principali TEADs. Liu-Chittenden e colleghi (2012) hanno recentemente trovato piccole molecole

della famiglia delle porfirine in grado di impedire la trascrizione delle proteine TEADs. È curioso notare che uno di questi composti, la Verteporfina, è già utilizzata per la terapia fotodinamica della degenerazione maculare dell'uomo (Liu-Chittenden *et al.*, 2012).

Un'altra possibilità terapeutica sono gli inibitori di Rho e Rock. Rho e F-actina sono fondamentali per il mantenimento di TAZ e questo è un fattore importantissimo clinicamente, in quanto già esistono dei farmaci che inibiscono Rho che potrebbero essere utilizzati per le sperimentazioni. Ad esempio i Bifosfonati inibiscono la prenilazione, ovvero l'aggiunta post-traduzione di gruppi isoprenoidi alle proteine, in modo da garantirne l'ancoraggio di Rho o altre proteine G. Questi sono già utilizzati come palliativi in caso di metastasi ossee (Lipton *et al.*, 2010). Un ulteriore esempio possono essere molecole che vedono come bersaglio enzimi fondamentali per la regolazione della contrattilità dell'actina, ovvero Rock e MLCK, e della miosina nella cellule non muscolari. In particolare l'inibitore di Rock Y27632 o l'inibitore della miosina Blebbistatina sembrano svolgere una buona azione nella soppressione di TAZ. Y27632 non è stato molto usato, ma altri composti come il fasudil (terapia cardiovascolare) e altri inibitori più potenti come AR-12286 sono già in sperimentazione per la terapia del glaucoma in fase III (Piccolo *et al.*, 2013). Si ritiene che la capacità del fasudil di attenuare la fibrosi tissutale possa essere sfruttata per impedire il collegamento tra la durezza dello stroma e TAZ (Amano *et al.*, 2010).

Inibitori di Wnt possono essere utilizzati in tumori caratterizzati da mutazioni che inattivano APC, come quelli colon-rettali, dove la quantità di TAZ è elevatissima (Piccolo *et al.*, 2013). L'utilizzo di trunkyrase-2-inibitori, sostanze in grado di ripristinare l'attività dell'Axina e quindi il complesso di degradazione della  $\beta$ -catenina e TAZ, potrebbero dare buoni risultati (Huang *et al.*, 2009).

Infine, un'ultima alternativa sono agonisti e antagonisti di recettori accoppiati a proteine G. Considerando il ruolo facilitante su YAP/TAZ di Rho, recenti studi suggeriscono che agonisti di GPCR, come LPA e S1P, promuovono la localizzazione nucleare di YAP/TAZ sostenendo Rho (Yu *et al.*, 2012). Antagonisti di LPA e S1P potrebbero risultare utili per una terapia più mirata contro YAP e TAZ (Yu *et al.*, 2012).

Si sottolinea, infine, che non esistono dati relativi a Hippo e YAP/TAZ in medicina veterinaria, nè in merito allo sviluppo embrionale nè in ambito oncologico.



## **2 SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo principale del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare l'espressione dei modulatori di fattori di trascrizione YAP e TAZ nel tessuto ghiandolare mammario neoplastico del cane e del gatto.

Tramite l'utilizzo della tecnica immunostochimica, si è voluto fare un'indagine preliminare della loro espressione nelle diverse classi istologiche, nei diversi gradi di differenziazione tumorale, nel cane e nel gatto, evidenziando anche eventuali similitudini o divergenze con la ghiandola mammaria sana.

La specificità anticorpale è stata valutata mediante tecnica di western blot, confrontata poi con i livelli di espressione in immunostochimica per i campioni inclusi.

Lo scopo è stato quello di ottenere i primi dati di espressione nel tumore mammario delle due specie domestiche indagando potenziali peculiarità e similitudini rispetto al tumore al seno della donna. È noto, infatti, che le specie domestiche potrebbero rappresentare dei modelli spontanei per lo studio della patologia umana e per l'identificazione di nuove terapie mirate.



## 3 MATERIALI E METODI

### 3.1 Campioni e raccolta dati

Le neoplasie feline e canine utilizzate in questo lavoro di tesi sono state selezionate dall'archivio dei campioni del Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione (BCA) della facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova. Tutte provenivano dalla quotidiana attività di diagnostica. Ogni singolo campione è stato ottenuto tramite chirurgia e fissato in formalina tamponata al 10%, rispettando un minimo rapporto fissativo/campione di 10 a 1.

In laboratorio i campioni sono stati poi inclusi in paraffina. Mediante l'utilizzo del microtomo sono state tagliate sezioni di 4µm che successivamente sono state utilizzate per la colorazione istologica con Ematossilina ed Eosina (H&E). I campioni sono stati poi classificati secondo il recente schema per le neoplasie mammarie canine di Goldschmidt e colleghi (2011) basata sulla classificazione originale della WHO (Goldschmidt *et al.*, 2011). Il grading delle lesioni maligne è stato effettuato mediante il sistema Elston ed Ellis (1991) modificato (Castagnaro *et al.*, 1998) per il gatto e secondo il sistema di Clemente e colleghi per il cane (Peña *et al.*, 2013). I criteri di malignità presi in considerazione includevano: un significativo pleomorfismo nucleare e citoplasmatico, la formazione di tubuli e l'indice mitotico misurato in 10 HPF (*high power fields*) con *cut off* superiore a 3.

Sono stati selezionati 44 campioni suddivisi come segue: per quanto riguarda i campioni felini, sei Carcinomi semplici tubulari di grado I (STC), sei carcinomi semplici di grado III (STC) e quattro tumori duttali (carcinomi duttali – DC / carcinomi intraduttali-papillari – IPDC); per i cani, invece, otto carcinomi semplici di grado I, sette carcinomi semplici di grado III (senza distinzione tra solidi o tubulari), sei carcinomi complessi di grado I (CC) e sette carcinomi semplici con mioepitelioma maligno (SCMM). In caso di lesioni multiple sul vetrino, si è preferito selezionare il più maligno. A tutto ciò vanno aggiunti 5 campioni di tessuto mammario non neoplastico che sono stati analizzati anch'essi tramite immunoistochimica.

Nello studio sono stati, inoltre, inclusi due campioni di neoplasia mammaria umana, ovvero dei carcinomi solidi infiltranti di grado III tripli negativi, tumori che non esprimono i recettori estrogenici (ER-), progesteronici (PR-) ed HER2 (human

epidermal growth factor receptor 2). Questi due tumori sono stati gentilmente forniti, dopo asportazione e con consenso firmato, dal gruppo di anatomia patologica umana dell'ospedale di Padova

### **3.2 Immunoistochimica**

L'immunoistochimica (IHC) è una procedura che consente di evidenziare la formazione di complessi antigene-anticorpo all'interno di un tessuto grazie ad appositi sistemi di rivelazione. È uno strumento particolarmente utilizzato nella caratterizzazione delle neoplasie e, in alcuni casi, viene considerata per questo scopo la tecnica "gold standard" (Ramos-Vara *et al.*, 2008).

Nel presente studio, sezioni di tessuto neoplastico derivanti da tumori mammari felini e canini di 4 µm di spessore su vetrini Superfrost®, dopo aver sostato in stufa a 37°C per 30 minuti, sono state processate con un immunocoloratore semi-automatico (BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA). Il macchinario può processare contemporaneamente fino a 30 vetrini con protocolli indipendenti grazie al riconoscimento automatico degli stessi tramite un sistema di codici a barre e l'utilizzo di piastre singole riscaldanti. Esso svolge ognuno dei passaggi della colorazione immunoistochimica (de-paraffinatura, smascheramento, incubazione, rivelazione e contro-colorazione) automaticamente, fatta eccezione per la sola aggiunta dell'anticorpo che deve essere svolta manualmente. Ogni altro reagente è aggiunto dalla macchina e mescolato sul vetrino tramite getti d'aria; l'evaporazione è impedita dalla stesura di una pellicola oleosa sopra alla sezione stessa. Alla fase di immersione in paraffina per la preparazione del vetrino e a quella di de-paraffinatura, seguono, quindi, uno smascheramento degli epitopi tramite impiego del *Cell Conditioning Solution (CC2)* per 60 minuti e un lavaggio con Option1 per 8 minuti. In un secondo momento avviene l'incubazione dell'anticorpo titolato 1:100 a temperatura ambiente per 60 minuti, lavaggio con Ultrablock di 4 minuti e controcolorazione di 4 minuti con ematossilina

Come sistema di rilevazione è stato utilizzato l'ultraView™ Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems), kit composto da cinque reagenti (DAB Inhibitor, HRP Multimer, DAB Chromogen, DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e DAB Copper) basato su un multimerico biotina-free che coniuga, su uno scheletro polimerico, anticorpo secondario e perossidasi Horseradish, adatto alla rilevazione indiretta di anticorpi primari di coniglio e di topo. Il risultato finale si rivela quindi con una colorazione marrone.

L'analisi immunohistochimica è stata compiuta attraverso l'utilizzo di un anticorpo primario policlonale *anti-WWTR1* per uomo e topo isolato nel coniglio (Sigma Aldrich, numero di catalogo T4077).

### **3.2.1 Valutazione delle positività**

Inizialmente è stata svolta un'analisi qualitativa al microscopio ottico di tutti i campioni, stabilendone la positività, data dalla colorazione brunastra, nucleare e citoplasmatica delle cellule luminali, mioepiteliali (in base alla tipologia di neoplasia), stromali e tessuto non neoplastico quando presente sul vetrino (iperplasie, ectasie ecc).

È stata poi svolta una valutazione della positività nucleare contando 100 cellule per 10 campi ad un ingrandimento di 40X, assegnando quindi una percentuale a 4 gruppi di nuclei con intensità simile suddivisa in: intenso, moderatamente intenso, lievemente intenso, negativo.

Poiché carcinomi complessi, carcinomi semplici con mioepitelioma maligno canini e tumori duttali felini possiedono come caratteristica la presenza di due popolazioni neoplastiche differenti, il conteggio di positività nucleare è stato effettuato separatamente per entrambe le popolazioni. È stata, infine, stabilita una percentuale di positività citoplasmatica per tutte le popolazioni.

### **3.2.2 Scoring**

Lo scoring della positività è stato eseguito utilizzando le 4 metodiche più comunemente accettate in letteratura, come segue:

- 1) H-score. Rappresenta la somma della percentuale dei nuclei lievemente positivi, la percentuale dei moderatamente positivi moltiplicata per 2 e la percentuale dei nuclei intensamente positivi moltiplicata per 3. Il tutto consiste in un insieme di indici con range 0-300.
- 2) Quick-Score. Rappresenta la somma del valore di intensità del nucleo (lieve 1, moderata 2, intensa 3) con il punteggio assegnato ad ogni percentuale di positività (negativo → 0, 1%-25% → 1, 26%-50% → 2, 51%-75% → 3, 76%-100% → 4).
- 3) IRS-Scale. Rappresenta il prodotto del valore di intensità del nucleo (lieve 1, moderata 2, intensa 3) per il punteggio assegnato ad ogni percentuale di

positività (negativo  $\rightarrow$  0, 1%-10%  $\rightarrow$  1, 11%-50%  $\rightarrow$  2, 51%-80%  $\rightarrow$  3, 81%-100%  $\rightarrow$  4).

- 4) Allred-Score o Total Score. Rappresenta la somma del punteggio per la percentuale di positività nucleare (negativo  $\rightarrow$  0, <1%  $\rightarrow$  1, 1%-10%  $\rightarrow$  2, 11%-33%  $\rightarrow$  3, 34%-66%  $\rightarrow$  4, 67%-100%  $\rightarrow$  5) e il punteggio di positività nucleare (lieve 1, moderata 2, intensa 3).

### 3.3 Analisi Statistica

Per l'analisi statistica è stato scelto di suddividere il Quick-score, l'IRS-scale e l'Allred-score in due sottogruppi. Il primo per il Quick-score, da qui in poi descritto come il Quick più rappresentativo ( $Q_r$ ), è la somma delle percentuali di positività lievi, moderate ed intense a cui poi è stato attribuito un punteggio, come scritto sopra, e a cui è stato ulteriormente sommato il valore di intensità della percentuale di positività più elevato. Similmente l'IRS più rappresentativo ( $IRS_r$ ) è stato calcolato sommando la percentuali di positività e assegnando un punteggio in base al loro valore, il quale è stato successivamente moltiplicato per il valore di positività nucleari più elevato. Per l'Allred più rappresentativo ( $Allred_r$ ) si è proceduto analogamente al Quick score.

Il secondo sottogruppo si compone degli stessi score e da qui in poi sarà sempre definito *medio* per ognuno di essi. Quindi, il Quick score medio ( $Q_m$ ) è stato calcolato facendo la media dei tre numeri risultanti dalla somma del valore di intensità del nucleo e il punteggio assegnato ad ogni percentuale di positività. L'IRS medio ( $IRS_m$ ) è stato calcolato facendo la media dei tre numeri risultanti dal prodotto del valore di intensità del nucleo e il punteggio assegnato ad ogni percentuale di positività. Infine l'Allred ( $Allred_m$ ) è stato valutato facendo la media dei tre valori risultanti dalla somma del valore di intensità del nucleo e il punteggio assegnato ad ogni percentuale di positività. L'H-score non ha subito divisioni, ma è stato utilizzato tal quale. Altro valore preso in considerazione per l'analisi statistica è stata la semplice somma delle percentuali di nuclei intensi, moderatamente intensi e lievemente intensi, da qui in poi definita sempre *IML%*. Per ultimo si è deciso di valutare statisticamente anche il diametro.

Date queste premesse, la prima parte dell'analisi statistica si è limitata a cercare correlazioni tra i metodi qui sopra espressi tramite 3 misure di correlazione: test di correlazione di Pearson, test di correlazione di Spearman e test di correlazione Tau b di Kendall.

La seconda fase è stata elaborata tramite test di Wilcoxon per campioni appaiati con il limite di significatività dei test che è stato fissato per  $P < 0,05$ .

La terza fase dell'analisi ha riguardato il test di confronto multiplo o tra più gruppi di Kruskal-Wallis e conseguente procedura di Dunn. L'ipotesi nulla  $H_0$  asseriva che i campioni provenissero dalla stessa popolazione, mentre  $H_a$  l'esatto opposto. Se il *p-value* calcolato fosse stato inferiore al livello di significazione  $\alpha = 0,05$ , si sarebbe dovuto rifiutare l'ipotesi nulla  $H_0$  e accettare l'ipotesi alternativa  $H_a$ . Il confronto è stato corretto tramite il metodo di Bonferroni.

### **3.4 Western blot**

Il western blot è stato effettuato su sei campioni di neoplasia mammaria. Due carcinomi tripli negativi di donna, due carcinomi canini complessi e due felini (un carcinoma tubulare e un carcinoma duttale). Lo scopo di questa metodica consiste nell'identificazione, mediante anticorpi specifici, di determinate proteine, previa separazione tra loro sulla base delle differenze di peso molecolare tramite elettroforesi.

L'intero processo si compone di tre parti principali:

1. Preparazione del campione
2. Elettroforesi
3. Western Blot

#### **3.4.1 Preparazione del campione**

La fase iniziale consiste nell'omogeneizzazione del tessuto di origine per separarne le proteine cellulari. I campioni erano preservati in Rna-later. 20  $\mu\text{g}$  di tessuto, diluiti in PBS (Tampone fosfato salino), sono stati omogeneizzati tramite Hybaid RiboLyser Homogenizer. Il tutto è stato poi centrifugato a 13000 giri al minuto per 10 minuti a  $4^\circ\text{C}$  in Eppendorf. 40  $\mu\text{l}$  di tampone lisante (2% di SDS, 10 mM di TRIS a 6,8 di pH e 10% di glicerolo) sono stati aggiunti ogni 100  $\mu\text{l}$  post centrifugazione per favorire la lisi cellulare e la solubilizzazione delle proteine. Sempre ogni 100  $\mu\text{l}$  sono stati aggiunti 2  $\mu\text{l}$  di cocktail di inibitori di proteasi (PIC, *protease inhibitor cocktail*), fondamentale per il rallentamento dei processi denaturativi e defosforilativi che sarebbero intervenuti con velocità notevole nel caso di proteine non più protette dalle cellule del tessuto di origine. Il surnatante è stato incubato per 10 minuti a  $4^\circ\text{C}$  e, dopo l'aggiunta della DNAsi, altri 5 minuti a temperatura ambiente. La determinazione della concentrazione

proteica è stata effettuata mediante il metodo di Lowry e colleghi (Lowry *et al.*, 1951). Le frazioni proteiche sono poi state conservate a -80°C.

Prima della fase elettroforetica è necessario che le proteine siano rese solubili e denaturate, al fine di garantire una più facile esposizione dell'epitopo a cui si potrà poi legare l'anticorpo. A tale scopo è stata utilizzata una soluzione contenente sodiododecilsofato (SDS), un detergente ionico, che con lo scopo di "srotolare" la proteina, rivelando la struttura primaria. A questa soluzione è stato associato anche il  $\beta$ -mercaptoetanololo, un agente riducente, al fine di aggredire i ponti di solfuro dei legami proteici. Inoltre l'SDS dovrebbe legare le molecole cariche delle proteine, mascherandole e rendendole elettricamente tutte uguali di modo che solo il loro peso molecolare influenzi la loro corsa nel gel sotto corrente elettrica.

### **3.4.2 Elettroforesi**

L'elettroforesi normalmente può essere monodimensionale (un piano solo di separazione) o bidimensionale. La più utilizzata (anche in questo studio) è la monodimensionale. Il metodo utilizzato per la separazione in base al peso molecolare è stato l'SDS-PAGE (*for Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*), tecnica che sfrutta un gel di poliacrilamide. Lo scopo consiste nello sfruttare le porosità del gel che si creano in base al tipo di preparazione e permettere un vero e proprio "filtraggio differenziale" proteico sotto corrente elettrica. Il gel normalmente si compone di due parti: un gel di caricamento o *stacking gel* e un gel di corsa o *running gel*; il primo possiede una bassa concentrazione di poliacrilamide (4%) per garantire una più superficiale separazione, eliminando le proteine di peso molecolare molto elevato. Il secondo, invece, è dotato di una concentrazione maggiore di poliacrilamide e di conseguenza una capacità di separazione maggiormente precisa. La grandezza dei pori del gel viene, infatti, determinata dalla percentuale totale di acrilamide presente e dalla quantità di legami crociati. Se la quantità totale di acrilamide aumenta, per proporzionalità inversa la grandezza del poro diminuisce. Comportamento simile possiede anche la percentuale dei legami crociati che si formano.

I gel di poliacrilamide derivano dalla polimerizzazione di due composti: l'acrilamide e l'N-methylenebis-acrylamide (abbreviato Bis). Il Bis funziona da agente per legami crociati. La reazione è scatenata dall'aggiunta di perossidissolfato d'ammonio al 10% e TEMED (tetrametiletilendiammina). Essendo il peso molecolare di TAZ attorno ai 50 kDa, il gel da corsa è stato preparato tramite una soluzione al 10%; 3ml di una soluzione

con tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (Tris-HCL) e lo 0,4% di sodio dodecilsolfato (SDS), sono stati mescolati ad una soluzione di 4ml di 29,2% di acrilamide e 0,8% di bisacrilamide (la quale a sua volta era stata preparata con 50% di glicerolo e acqua). La soluzione con i catalizzatori (40 $\mu$ l per 12 ml di ammonio persolfato al 10% e 20  $\mu$ l per 12ml di TEMED) è stata messa in un miscelatore insieme alla precedente. La soluzione del gel di caricamento è stata preparata similmente, naturalmente con valori diversi. La polimerizzazione avviene in una camera apposita. I gel sono stati, quindi, immersi in tampone da corsa con PH di 8,3 circa.

I pozzetti, creati tramite inserimento di uno specifico pettine durante la fase di preparazione dei gel, sono stati riempiti con i campioni solubilizzati. Il movimento delle proteine attraverso i gel normalmente è dato dal flusso di elettroni che lo attraversano dall'alto verso il basso.

Sono stati utilizzati dei controlli positivi per dimostrare che le corsie del gel fossero state preparate in modo uniforme. Avendo svolto l'analisi su campioni diversi, era fondamentale dimostrare l'uniformità di metodo. Si è scelto di utilizzare la  $\beta$ -actina (43 KDa) come controllo, un'isoforma delle sei actine normalmente presenti nei tessuti e una delle due che compongono i filamenti actinici nel citoscheletro delle cellule non muscolari. Questo controllo positivo è stato utilizzato per verificare che venisse caricata la medesima quantità di proteine di ciascun campione, oltre che per verificare il trasferimento delle proteine stesse dal gel alla nitrocellulosa (vedi oltre) e confermare che ciò avvenisse in modo omogeneo.

### **3.4.3 Western Blot**

La fase di western blot *in sensu stricto* inizia con il trasferimento elettroforetico delle proteine dal gel ad un foglio di nitrocellulosa (Blot), sfruttando nuovamente la corrente elettrica. La nitrocellulosa, essendo dotata di una propria carica e di porosità, riesce ad immobilizzare le proteine. Il procedimento è iniziato ponendo il gel sopra un foglio di nitrocellulosa, il tutto compreso tra due spugne, creando una sorta di *sandwich*, che è stato poi collocato in una camera di trasferimento riempita con una soluzione apposita. Il tutto è molto simile alla fase precedente, con la differenza sostanziale che il flusso elettrico in questo caso scorre in senso trasversale rispetto al gel e al foglio, e non più in senso longitudinale. La verifica del corretto trasferimento sul blot è stata effettuata colorandolo con una soluzione al 10% di Ponceau Red, idrosolubile e soprattutto reversibile.

Giunti a questa fase, i passaggi successivi sono tutti indirizzati all'evidenziare, tramite colorazione, la proteina di interesse. La prima fase è stata quella di saturare il blot, ovvero cercare di impedire che molecole che compongono la nitrocellulosa reagissero con l'anticorpo primario o secondario utilizzati, creando falsi positivi. Ciò avviene mediante l'utilizzo di proteine inerti, quali il latte o l'albumina sierica bovina (BSA). Nel nostro caso è stata utilizzata quest'ultima, in quanto il latte contiene fosfoproteine, che rischiavano di comportare legami impropri con l'anticorpo primario (YAP/TAZ, infatti, nel citoplasma normalmente sono sottoposti a fosforilazione). Sostanzialmente il risultato di questa fase consisteva nel coprire tutti gli spazi vuoti della membrana di nitrocellulosa, non occupati dalle proteine trasferite. La fase successiva è consistita nell'immergere il blot in una soluzione tampone contenente l'anticorpo primario, specifico per gli epitopi della proteina di interesse. Sono stati poi utilizzati 6 $\mu$ l di un anticorpo policlonale anti-Taz isolato in coniglio (Sigma Aldrich, HPA007415), con diluizione 1/1000 in Tris-HCl a pH 7,5. L'incubazione a 4°C è durata tutta la notte in lieve agitatore. Il mattino seguente sono stati effettuati 3 lavaggi della durata di 5 minuti cadauno, con lo scopo di eliminare gli anticorpi che non avevano legato.

Tramite il passaggio successivo è stato incubato con anticorpo secondario, il quale doveva formare un legame con l'immunocomplesso creatosi precedentemente tra l'anticorpo primario e la proteina di interesse. Il secondario riconosceva l'immunoglobulina della specie animale in cui è stato utilizzato l'anticorpo primario, in questo caso il coniglio. L'anticorpo secondario normalmente è coniugato con la fosfatasi alcalina, che in un ambiente alcalino, costituito principalmente da una miscela di due sali, quali il bromo-cloro indolil solfato (BCIP) e il nitroblu di tetrazolio (NBT), catalizza la rimozione del gruppo fosforico dal primo. Questo gruppo è ora libero di legarsi al secondo composto, il quale forma un precipitato insolubile, visibile ad occhio nudo. È logico che questa precipitazione avviene solo dove è presente la fosfatasi alcalina e quindi dove sono presenti gli anticorpi e la proteina a cui si sono legati. L'anticorpo secondario utilizzato era un *anti-rabbit* della Sigma Aldrich (1  $\mu$ l), incubato un'ora e diluito in 10 ml di soluzione tampone. Il controllo positivo è stato effettuato tramite  $\beta$ -actina.

## 4 RISULTATI

### 4.1 Anamnesi

I campioni di tumore mammario di cane e gatto selezionati per questo lavoro di tesi erano in origine 49, ripartiti in 7 tipologie tumorali sulla base della valutazione istologica. Tuttavia, dopo la processazione immunohistochimica e la valutazione quantitativa è stato deciso di eliminarne cinque, in quanto la colorazione non sembrava omogeneamente distribuita a tutto il campione, ma concentrata in determinate zone della sezione, e non si è voluto includerle per non rischiare di compromettere una valutazione oggettiva. L'analisi qualitativa di questi campioni non ha comunque segnalato contraddizioni con gli altri; in questo lavoro, alla fine, sono stati analizzati i 44 casi rimanenti.

Di questi 44 campioni, 16 erano felini, di cui 15 femmine e un maschio. La media di età era 11,94 anni e la moda di 13. Eccetto un esemplare di razza soriana e un meticcio, 14 campioni (l'87,5%) appartenevano alla razza comune europeo e, escluso il maschio, 11 esemplari femmina su 15 (73% circa) risultavano avere subito ovariectomia o ovaristerectomia; tuttavia, i dati in nostro possesso erano insufficienti per trarre possibili correlazioni tra l'età dell'intervento e quella di comparsa dei noduli mammari. Gli unici 4 animali interi presentavano un carcinoma di grado III (Tabella 1).

I 28 cani analizzati rappresentavano una popolazione più eterogenea: due setter inglesi, uno shitzu, otto meticci, due dalmata, due pastori tedeschi, due yorkshire terrier, un fox terrier, un pintscher, un barboncino, un pastore scozzese, un labrador retriever, un golden retriever, un barbone, un boxer e tre casi in cui non era stata specificata la razza. Erano tutte femmine e solo 8 di queste (28,57%) avevano subito ovariectomia. Non si sono evidenziate particolarità degne di nota, se non il fatto che tutte le neoplasie di grado III appartenevano a cagne intere (Tabella 2).

Facevano parte delle specie canina e felina anche i cinque campioni di tessuto mammario risultati non tumorali alla diagnosi, tutti ottenuti durante le necrosopie di routine presso il dip. BCA o da campioni biotipici inviati presso lo stesso dipartimento e risultati non tumorali alla diagnosi.

**Tabella 1.** Elenco gatti presi in esame con indicazioni anamnestiche.

<b>Caso</b>	<b>Età</b>	<b>Ovariectomia</b>	<b>Razza</b>	<b>Sede lesione</b>
<b>1</b>	7	Si	Soriano	Inguinale
<b>2</b>	11	Si	CE	Inguinale sx
<b>3</b>	13	Si	CE	Linea mammaria sx
<b>4</b>	13	Maschio	CE	Toracica sx
<b>5</b>	12	Si	CE	II e IV dx
<b>6</b>	10	Si	CE	Linea mammaria sx
<b>7</b>	15	No	CE	III e IV
<b>8</b>	10	No	CE	Non specificato
<b>9</b>	8	No	CE	Linea sx e dx
<b>10</b>	16	No	CE	I e II sx
<b>11</b>	13	Si	CE	Linea sx
<b>12</b>	9	Si	CE	Linea dx
<b>13</b>	11	Si	CE	Non specificato
<b>14</b>	15	Si	CE	III sx
<b>15</b>	15	Si	CE	IV sx
<b>16</b>	13	Si	Meticcio	V sx e dx, ne aveva due in più

“sx”: sinistra; “dx”: destra; “CE”: comune europeo; “sede lesione”: ghiandola mammaria. L’età è espressa in anni.

**Tabella 2.** Cani presi in esame con indicazioni anamnestiche.

<b>Caso</b>	<b>Età</b>	<b>Ovariectomia</b>	<b>Razza</b>	<b>Sede lesione</b>
<b>1</b>	12	Si	Setter inglese	IV e V dx
<b>2</b>	13	No	Shitzu	IV dx
<b>3</b>	8	No	Meticcio	IV dx
<b>4</b>	13	No	Dalmata	No specificato
<b>5</b>	15	No	Meticcio	Linea sx
<b>6</b>	11	Si	Pastore Tedesco	III sx
<b>7</b>	11	Si	Meticcio	/
<b>8</b>	12	Si	Yorkshire Terrier	/
<b>9</b>	13	No	Meticcio	IV e V sx
<b>10</b>	8	No	No specificato	Linea sx
<b>11</b>	12	Si	Pastore Tedesco	Linea sx
<b>12</b>	9	No	Fox Terrier	Toracica caudale sx
<b>13</b>	13	No	Pintscher	/
<b>14</b>	9	No	Barboncino	V dx
<b>15</b>	5	Si	Meticcio	III, IV e V fila dx
<b>16</b>	13	Si	Setter Inglese	III sx
<b>17</b>	10	Si	Meticcio	III dx
<b>18</b>	8	No	Non specificato	Linea sx
<b>19</b>	/	/	/	/
<b>20</b>	12	No	Meticcio	/
<b>21</b>	10	No	Pastore Scozzese	V sx
<b>22</b>	13	No	Yorkshire Terrier	Linea sx
<b>23</b>	10	No	Dalmata	Inguinale dx
<b>24</b>	11	No	Labrador Retriever	II dx
<b>25</b>	10	No	Golden Retriever	IV dx e sx
<b>26</b>	8	No	Barbone	II
<b>27</b>	8	No	Boxer	IV sx
<b>28</b>	15	no	Meticcio	/

“sx”: sinistra; “dx”: destra; “CE”: comune europeo; “sede lesione”: ghiandola mammaria. “Linea”: linea mammaria. L’età è espressa in anni.

## 4.2 Istopatologia

I campioni sono stati selezionati sulla base della valutazione istologica e raggruppati in 7 categorie (Tabella 3) secondo la recente classificazione riportata in Appendice III.

Sei erano carcinomi semplici felini di grado I. All'interno di questo gruppo eterogeneo erano compresi tre carcinomi tubulari, due carcinomi cisto-papillari e un carcinoma tubulo-papillare. In quattro di questi è stata inoltre rilevata ectasia duttale, in uno iperplasia lobulare associata, in due una papillomatosi da moderata a grave ed infine nel carcinoma cistopapillare la ghiandola controlaterale era interessata da uno stesso tumore di grado II. In un solo caso vi era tessuto linfonodale iperplastico associato (Tabella 3).

La sede della lesione era sembrata variabile e, come in tutti i casi, sfuggiva a qualsiasi categorizzazione, complice anche il fatto che spesso i dati anamnestici non erano sufficienti, limitandosi a definire se si trattasse della linea mammaria destra piuttosto che sinistra.

Sei carcinomi semplici felini erano, invece, di grado III: tre carcinomi tubulari (di cui uno associato a noduli multipli di carcinoma cisto-papillare), un carcinoma comedonico infiltrante, un carcinoma solido e un carcinoma tubulare. Quest'ultimo, in particolare, era associato ad adenoma semplice, adenoma tubulare, metastasi linfonodali avanzate e accompagnato nella linea mammaria controlaterale da noduli multipli di carcinoma tubulare e tubulo-papillare, carcinoma comedonico, adenoma semplice ed iperplasia lobulare, il tutto il tutto con la presenza di ectasia ed iperplasia duttale e invasione vascolare (Tabella 3). Gli altri casi risultavano associati a linfadenopatia iperplastica reattiva, iperplasia lobulare diffusa e ampie aree di necrosi.

Quattro casi erano carcinomi felini di tipo duttale (Tabella 3). Tre di questi erano carcinomi duttali propriamente detti, secondo quanto recentemente proposto da Zappulli e colleghi (2013). I carcinomi duttali presentano una doppia popolazione di cellule epiteliali luminali e di cellule mioepiteliali che mantengono una differenziazione basale. Questa popolazione mioepiteliale si compone di cellule che si espandono nell'interstizio organizzate in cordoni separati da lumi emulanti semplici fessure. Si tratta generalmente di tumori poco aggressivi, dei quali solo uno di quelli presi in esame in questo studio risultava associato ad iperplasia lobulare atipica. Curiosamente quest'ultimo caso si è sviluppato in una quinta coppia di ghiandole mammarie, quando normalmente nel felino ci sono solo quattro coppie. Un quarto campione apparteneva alla categoria dei carcinomi intraduttali-papillari, che mostrano una crescita di papille fibrovascolari

all'interno di dotti ectasici con cellule luminali supportate da un monostrato di cellule mioepiteliali e presentano anch'essi un andamento solitamente meno aggressivo (Zappulli *et al.*, 2013). Un quinto campione era stato escluso dalle analisi a causa di artefatti tecnici.

Rivolgendo l'attenzione ai cani, 7 casi appartenevano alla categoria dei carcinomi semplici associati a mioepitelioma maligno (SCMM). In questa tipologia (Tabella 3) entrambe le popolazioni sono maligne. La prima è composta da cellule tubulari-colonnari generalmente disposte a formare tubuli o nidi irregolari; la seconda, in espansione nell'interstizio, presenta cellule di forma fusata, con citoplasma poco definito, eosinofilo o basofilo, un nucleo centrale tondo punteggiato di cromatina e un solo nucleolo. Anisocariosi e anisocitosi sono spesso presenti insieme a numeri variabili di mitosi anomale. La certezza diagnostica nei casi dubbi si effettua mediante immunohistochimica per p63, un marcatore tipico del mioepitelio insieme a calponina e vimentina.

Come spesso succede nei cani, diverse tipologie tumorali possono essere presenti contemporaneamente sia nello stesso animale sia nella stessa ghiandola.

In un caso il tumore era associato ad un carcinoma complesso, un osteosarcoma, e un linfonodo con iperplasia. In un altro, la neoplasia contigua mostrava forme più benigne con noduli di adenoma semplice, adenoma complesso, e linfoadenopatia iperplastica reattiva. Interessante la contemporanea presenza in un campione di carcinoma solido di grado II, carcinoma semplice tubulare di grado II e carcinoma complesso di grado I lungo tutta la linea mammaria sinistra. L'iperplasia lobulare e l'ectasia duttale rimanevano comun denominatori nelle aree adiacenti questi tumori.

Il carcinoma complesso, invece, possiede una componente epiteliale maligna e un mioepitelio più benigno. Rappresenta, quindi, una neoplasia con cellule epiteliali formanti tubuli irregolari, a volte associati a necrosi focali o multifocali e con una seconda popolazione, a cellule mioepiteliali tipiche ben differenziate. Questo gruppo era costituito da sei casi (Tabella 3). In un cane il carcinoma era associato a noduli di adenoma semplice, iperplasia lobulare e linfoadenopatia iperplastica reattiva, mentre in un altro diverse ghiandole erano interessate da altrettanto diverse tipologie tumorali quali il carcinoma tubulare o il misto; un terzo possedeva un carcinoma complesso a livello della terza ghiandola sinistra, mentre la controlaterale e la quinta di destra erano interessate da un carcinoma papillare intra-duttale di grado II, un adenoma complesso, iperplasia lobulare ed ectasia duttale.

La terza categoria dei tumori mammari dei cani era rappresentata da 8 carcinomi semplici di grado I (Tabella 3). In questi, l'attuale classificazione compie una distinzione in tubulari, tubulo-papillari, cisto-papillari, cribriformi. Tutti sono accomunati dalla presenza di una sola popolazione cellulare principale: nei tubulari quest'ultima forma principalmente dei tubuli di una o due linee cellulari; i tubulo-papillari sono simili ai precedenti, ma differiscono per la formazione di papille fibrovascolari che si addentrano all'interno dei tubuli; i cisto-papillari possiedono papille che si insinuano all'interno di tubuli che formano cavità cistiche; infine, i cribriformi sono i più rari e la popolazione epiteliale nei tubuli assume la forma di setacci o di crivelli, spesso legati tra loro da ponti di cellule neoplastiche. Anche in questi animali più tipologie tumorali erano presenti. Si spaziava da situazioni in cui il carcinoma semplice era accompagnato solamente da iperplasia lobulare, a situazioni in cui si riconoscevano un carcinoma tubulo-papillare, un tubulare, un adenoma complesso e linfadenopatia iperplastica reattiva. In un campione vi erano più noduli di carcinoma tubulare contigui, con iperplasia lobulare.

L'ultimo gruppo era costituito da 7 carcinomi semplici di grado III (Tabella 3). A parte un caso di carcinoma tubulare-papillare, erano tutti carcinomi solidi, neoplasie solitamente aggressive in cui le cellule formano tappeti e aree solide. In un particolare caso di carcinoma solido l'associazione era con un carcinoma tubulare di grado II, noduli multipli di carcinoma in situ, tumore misto benigno, iperplasia lobulare diffusa e linfadenopatia iperplastica. Si è potuto constatare che, escluso un animale, l'iperplasia lobulare e la linfadenopatia iperplastica reattiva erano sempre presenti, talvolta accompagnate da ectasia lobulare, scirrosi, metastasi linfonodali e vascolari.

**Tabella 3.** Informazioni Istopatologiche dei campioni presi in esame.

<b>Gruppo</b>	<b>N</b>	<b>Specie</b>	<b>Tumore</b>	<b>Diametro (mm)</b>	<b>Grado</b>
1	1	Gatto	Carcinoma Tubulare	4	I
1	2	Gatto	Carcinoma Tubulare	15	I
1	3	Gatto	Carcinoma Cisto-papillare	7	I
1	4	Gatto	Carcinoma Tubulo-papillare	20	I
1	5	Gatto	Carcinoma Cisto-papillare	3	I
1	6	Gatto	Carcinoma Tubulare	10	I
2	1	Gatto	Carcinoma Tubulare	10	III
2	2	Gatto	Carcinoma Cisto-papillare e Tubulare	12	III
2	3	Gatto	Carcinoma Tubulare	11	III
2	4	Gatto	Carcinoma Solido	20	III
2	5	Gatto	Carcinoma Comedonico	10	III
2	6	Gatto	Carcinoma Tubulo	13	III
3	1	Gatto	Carcinoma Duttale	10	I
3	2	Gatto	Carcinoma Duttale	3	I
3	3	Gatto	Carcinoma Duttale	8	I
3	4	Gatto	Carcinoma Intraduttale- Papillare	5	I
4	1	Cane	SCMM	35	I
4	2	Cane	SCMM	25	I
4	3	Cane	SCMM	10	I
4	4	Cane	SCMM	35	I
4	5	Cane	SCMM	25	I
4	6	Cane	SCMM	12	I
4	7	Cane	SCMM	25	I
5	1	Cane	Carcinoma Complesso	10	I
5	2	Cane	Carcinoma Complesso	10	I
5	3	Cane	Carcinoma Complesso	6	I
5	4	Cane	Carcinoma Complesso	14	I
5	5	Cane	Carcinoma Complesso	8	I
5	6	Cane	Carcinoma Complesso	5	I
6	1	Cane	Carcinoma Papillare- Intraduttale	3	I
6	2	Cane	Carcinoma Papillare- Intraduttale	1	I
6	3	Cane	Carcinoma Papillare-	4	I

Intraduttale					
6	4	Cane	Carcinoma Tubulare	5	I
6	5	Cane	Carcinoma Tubulare	2	I
6	6	Cane	Carcinoma Tubulare	3	I
6	7	Cane	Carcinoma Tubulo-Papillare	7	I
6	8	Cane	Carcinoma Tubulare	13	I
7	1	Cane	Carcinoma Solido	13	III
7	2	Cane	Carcinoma Tubulare-Papillare	5	III
7	3	Cane	Carcinoma Solido	30	III
7	4	Cane	Carcinoma Solido	5	III
7	5	Cane	Carcinoma Solido	8	III
7	6	Cane	Carcinoma Solido	9	III
7	7	Cane	Carcinoma Solido	8	III

“N”: numero campione. “SCMM”: carcinoma semplice e mioepitelioma maligno.

Vista la coesistenza di più sottotipi tumorali, per l’indagine immunoistochimica si è selezionato sempre la lesione più maligna di una determinata sezione di tessuto, stabilita in base alle 7 categorie sopra descritte, escludendo neoplasie presenti in altre mammelle dello stesso individuo.

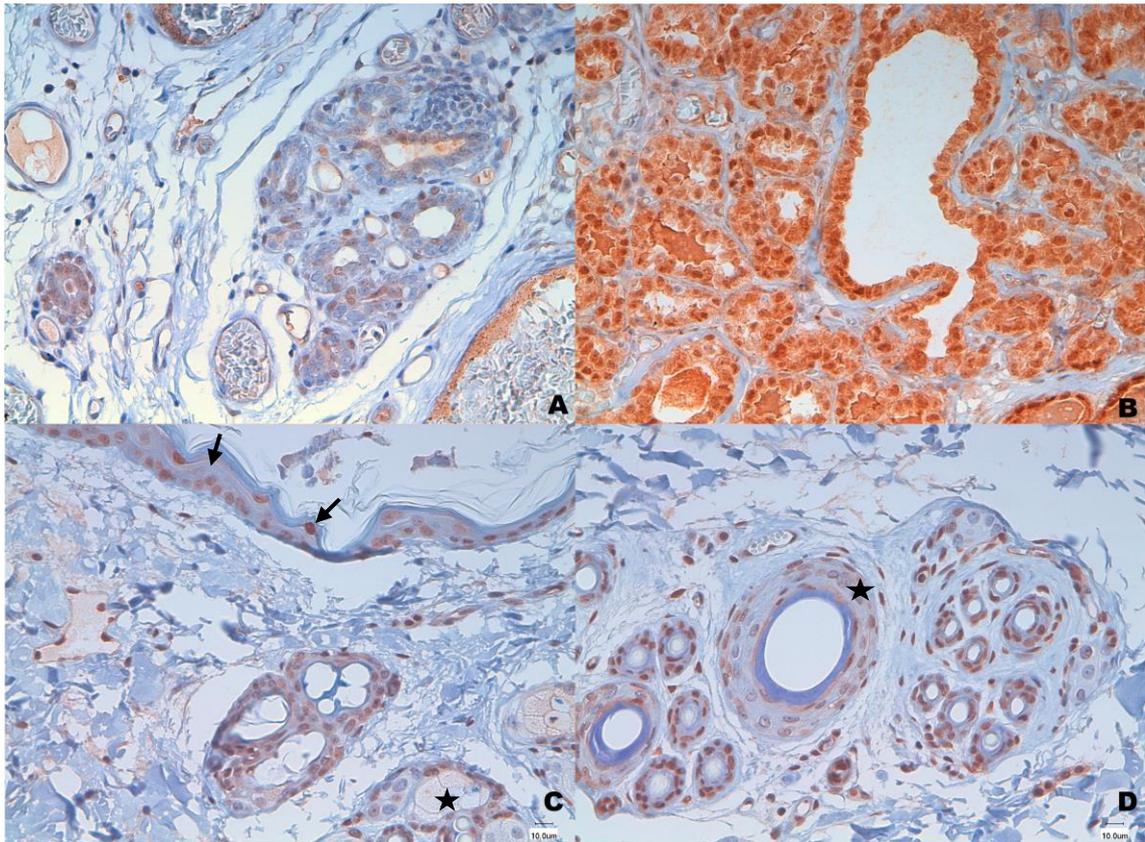
L’analisi istopatologica è stata eseguita anche nei 5 campioni di tessuto non tumorale. Due cani e due dei gatti manifestavano iperplasia lobulare con compresenza di ectasia duttale, mentre nel quinto gatto la mammella era completamente normale.

### 4.3 Immunoistochimica

L’iniziale valutazione qualitativa consisteva nella presa visione delle positività nucleari e/o citoplasmatiche per YAP/TAZ osservando le popolazioni neoplastiche, lo stroma e, laddove presente, la ghiandola mammaria sana.

Nei campioni di tessuto non tumorale (Figura 9) la positività citoplasmatica dell’epitelio luminale era molto lieve, se non assente in alcuni campi di ingrandimento. I nuclei delle cellule basali avevano intensità variabile, solitamente maggiore di quella delle cellule epiteliali luminali. Lo stroma manifestava sempre nuclei intensamente positivi, similmente a tutti i tessuti mesenchimali periferici e dermici come vasi, nervi e tessuto connettivo. In aggiunta, nei campioni di cute adiacenti al tessuto mammario (sia normale sia neoplastico) si è sempre evidenziata una specifica positività nucleare delle cellule dello strato basale dell’epidermide e di rari cheratinociti (Figura 9). Similmente a

livello di follicoli piliferi primari e secondari, semplici e composti, è stato possibile notare come la guaina interna della radice presentasse YAP/TAZ intranucleari (Figura 9). Particolarmente interessanti erano le positività della cuticola della guaina interna della radice e dello strato epiteliale lucido. Altra localizzazione con positività intense era lo strato basale ghiandolare apocrino e, per quanto meno evidente, sebaceo. Questa positività non ha risentito di differenze specie-specifiche tra cane e gatto.



*Figura 9 Espressione immunoistochimica di YAP/TAZ. A: cane, ghiandola mammaria sana con i nuclei delle cellule basali dotati di intensità maggiore rispetto alle cellule epiteliali luminali (40X). B: cane, lobuli ghiandolari moderatamente iperplastici in attività secernente e tubuli ectasici contenenti residui di secreto (40X). C e D: annessi cutanei e cute di gatto (40X), si noti la positività nucleare epidermica sia basale sia di occasionali cheratinociti (freccia) e quella delle cellule basali degli annessi piliferi e ghiandolari (stella a 5 punte).*

I due tumori umani tripli-negativi utilizzati hanno dimostrato una positività citoplasmatica diffusa lieve e nuclei raramente positivi, localizzati in particolari aree del campione, comportando la diminuzione della percentuale media in dieci campi al di sotto del 3% e 5% rispettivamente. Lo stroma è parso in linea con quanto visto nelle altre specie (Figura 10).

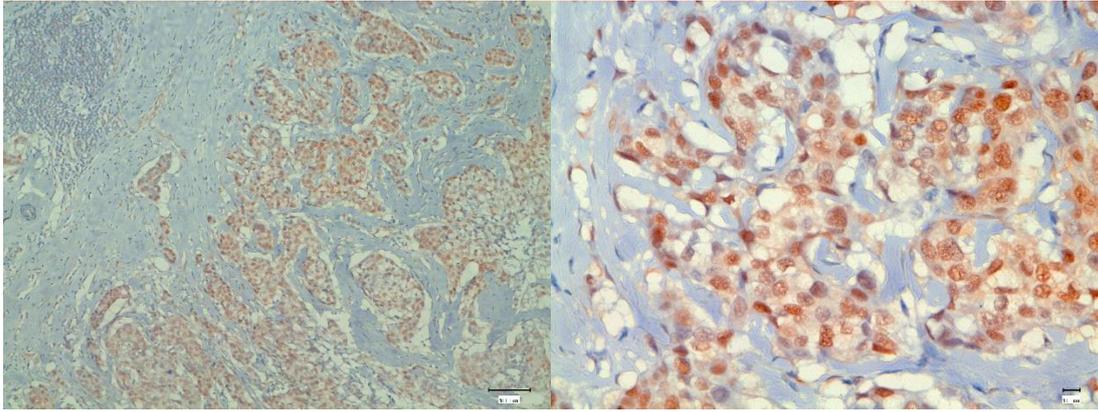


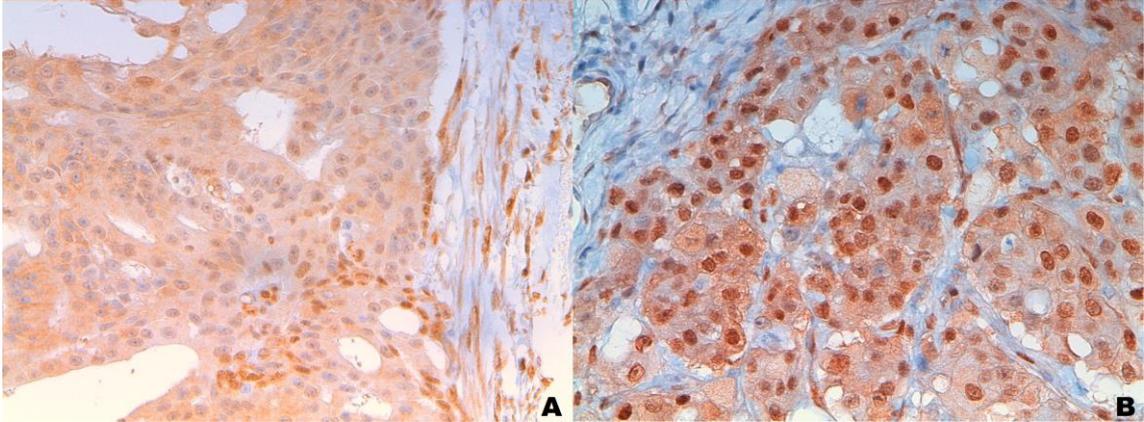
Figura 10 Espressione immunoistochimica di YAP/TAZ. Carcinoma mammario solido infiltrante di grado III triplo negativo di donna a 20X (sinistra). Visibile (a destra) un dettaglio a 40X.

Per quanto concerne i carcinomi di grado I felini (Figura 11), la tendenza era quella di avere una popolazione luminale positiva, con intensità da scarsa a moderata. I nuclei intensi rappresentavano circa il 7,67% ( $\pm 3,99$ ), i moderati il 19,83% ( $\pm 4,91$ ) e i lievi il 41,83% ( $\pm 9,41$ ), con un 69% ( $\pm 12,42$ ) circa di positività totale (Tabella 4). Il diametro medio si accostava attorno ai 9,83 mm ( $\pm 6$ ). Il citoplasma era spesso sopra il 90% di positività. La ghiandola sana adiacente ai tumori, laddove presente, mostrava una positività simile ai tessuti di controllo non tumorali con una componente basale positiva e luminale tendenzialmente negativa.

Un tumore di grado I, al di fuori di questo lavoro di tesi, si era rivelato, ad una più attenta valutazione, essere di grado II. È stato quindi escluso da tutte le analisi successive, ma sono stati conteggiati anche i suoi nuclei: presentava un comportamento simile agli altri carcinomi semplici di grado I, con un 10% di nuclei intensi, 25% di medi e 50% di lievi e un citoplasma per l'85% positivo.

Nei tumori di grado III (Figura 11) le cellule luminali erano positive con un'intensità variabile dall'intenso (che in alcuni casi supera il 45% dei nuclei, con una media di 21,5% e una deviazione standard di 13,07) al moderatamente intenso con il 32,83% ( $\pm 13,31$ ), arrivando a 53% in un particolare campione. Il 31,17% ( $\pm 9,35$ ) di nuclei lievemente positivi ha portato ad 85,5% ( $\pm 16,25$ ) la somma media totale, ricordando, però, che in almeno 4 casi, questa superava l'85% e in uno rappresentava il 100% (Tabella 4). Due peculiari situazioni, hanno mostrato delle positività largamente inferiori rispetto alla media; ciò spiega una così elevata deviazione standard (Appendice IV). La percentuale di nuclei negativi in questa tipologia tumorale era apparsa variabile, superando in un caso il 38%, mentre si manteneva al di sotto del 10% negli altri, con

una media di 14,5% ( $\pm 16,24$ ). Il diametro medio di questa categoria era 12,6 mm ( $\pm 3,44$ ). Il citoplasma variava da un 60% di positività in alcune aree al 100% in altre, portando la media di tutti i carcinomi di grado III a 85,5% ( $\pm 18,1$ ).



*Figura 11 Espressione immunoistochimica di YAP/TAZ. A: gatto, carcinoma mammario semplice di grado I (40X). B: gatto, carcinoma mammario solido di grado III (40X).*

Nei carcinomi duttali e intraduttali papillari felini (Figura 12) si è constatato, invece, una maggiore positività nucleare con intensità notevole a livello della popolazione basale/mioepiteliale, mentre quella epiteliale appariva più moderata (5% $\pm 1,87$  di positività moderata e 23,75% $\pm 4,15$  di lieve), con più del 70% di cellule negative e il citoplasma positivo al di sopra del 90% (Tabella 4). La popolazione basale/mioepiteliale intensa, in un caso, è arrivata al 60% di nuclei positivi intensi, per il resto mantenendosi sempre al di sotto del 32% (28,5% $\pm 21$ ); 27,75% ( $\pm 16,52$ ) i nuclei moderati e il 23,75% ( $\pm 15,76$ ) dei lievi, rappresentavano la media di valori molto variabili. Il diametro era mediamente di 6,5 mm $\pm 2,69$ .

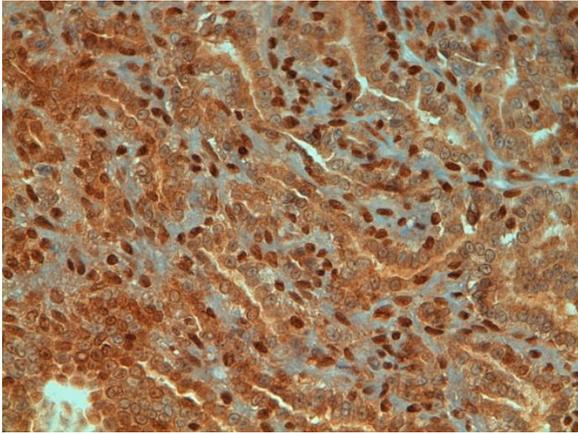


Figura 12 Espressione immunoistochimica di YAP/TAZ prevalente nei nuclei delle cellule basali/mioepiteliali del tumore. Carcinoma duttale felino di grado I (40X).

In due adenomi adiacenti ai carcinomi descritti, le positività nucleari del mioepitelio erano state quantificate mediamente con l'1% di intensi, il 5% di moderati e 37% di lievi. La popolazione luminale di questi si avvicinava molto alla corrispondente variante carcinomatosa. I diametri medi erano di 6,5 mm ( $\pm 2,69$ ).

Per quanto riguarda i carcinomi maligni canini, i carcinomi semplici con mioepitelioma maligno (SCMM) si sono dimostrati i più difficili nella valutazione e, soprattutto, nella scelta della popolazione cellulare da prendere in considerazione.

Innanzitutto ci si è posti il problema della loro differenziazione dai carcinomi complessi, non essendo talvolta semplice, limitandosi alla sola colorazione con ematossilina ed eosina. I carcinomi che suscitavano maggiori dubbi nell'interpretazione istologica sono stati verificati tramite immunoistochimica con ricerca di uno dei marcatori tipici del mioepitelio tra cui la citocheratina 14, la calponina, o p63 secondo una metodica qui non riportata e svolta sulla base di studi precedenti (Rasotto *et al.*, 2014). Per quanto riguarda la valutazione della positività, le cellule epiteliali di questi tumori venivano spesso soppiantate dalla componente mioepiteliale maligna prevalente, risultando pertanto di difficile valutazione. I tubuli epiteliali in 5 casi su 7 non erano più presenti in quantità adeguata. Nei due casi valutabili, si è visto che i nuclei di questa popolazione mediamente apparivano intensamente positivi per il 10,75% ( $\pm 9,51$ ), moderatamente positivi per il 26% ( $\pm 18$ ), lievemente positivi per il 44,25% ( $\pm 23,15$ ). Il citoplasma molto variabile era caratterizzato da una media di positività dell'83,25% ( $\pm 42,74$ ).

Con il 15% ( $\pm 9,26$ ) di positività nucleari intense, 25% ( $\pm 9,35$ ) di moderate, 44,29% ( $\pm 12,5$ ) di lievi, il mioepitelio maligno si è dimostrato essere la popolazione prevalente

in quasi tutti i campioni, con citoplasma positivo sempre sopra l'80% (83,57% di media  $\pm 9,39$ ) (Figura 13) (Tabella 4). In un SCMM è apparso evidente un principio di differenziazione squamosa delle cellule mioepiteliali, queste mostravano nuclei negativi, con qualche accenno di reazione a livello citoplasmatico. I diametri medi erano di 23,86 mm ( $\pm 9,14$ ).

Data l'esigua presenza della componente epiteliale, nelle analisi statistiche successive è stata considerata solamente la popolazione cellulare maligna più presente, ovvero quella mioepiteliale.

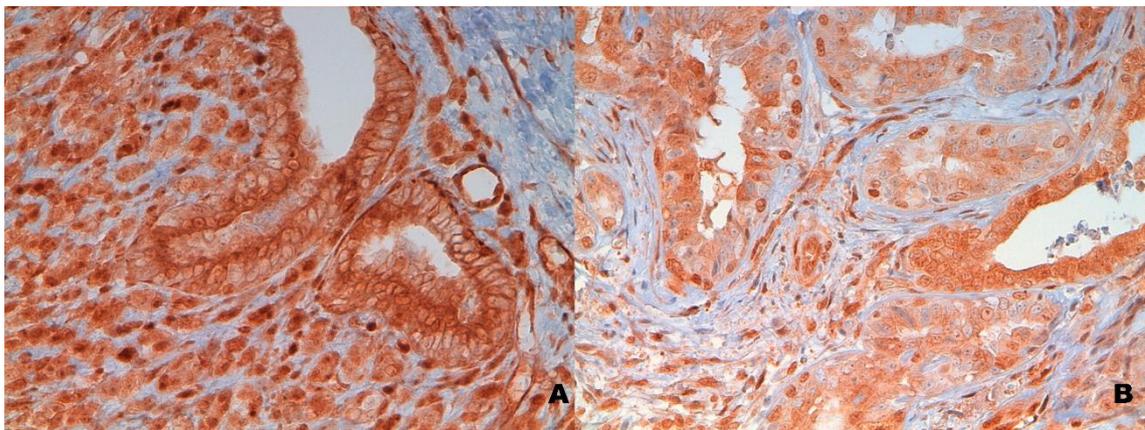


Figura 13 Espressione immunoistochimica di YAP/TAZ. A: cane, carcinoma mammario semplice di grado I associato a mioepitelioma maligno (SCMM) (40X). B: cane, carcinoma complesso di grado I (40X).

I carcinomi complessi (Figura 13), al contrario, sono stati valutati per la positività nucleare delle cellule epiteliali con valori non elevati pari a 10,83% ( $\pm 4,34$ ) di intensi, 24% ( $\pm 5,32$ ) di moderati, 35% ( $\pm 15,7$ ) di lievi ed un restante 30,17% ( $\pm 14,16$ ) circa di negativi; il tutto riassumibile in un 69,83% ( $\pm 14,16$ ) di nuclei e 96,17% ( $\pm 3,89$ ) di citoplasma positivi (Tabella 4).

Il mioepitelio, invece, presentava positività più elevate. Il 26,17% ( $\pm 12,29$ ) erano nuclei intensi, mentre 30,16% ( $\pm 8,17$ ) e 24,7% ( $\pm 4,15$ ) erano rispettivamente le medie delle positività moderate e lievi. La somma di queste percentuali ha portato all'81% ( $\pm 15,17$ ). I diametri medi erano di 8,83 mm ( $\pm 2,97$ ).

I carcinomi semplici (Figura 14) hanno mostrato il 7,1% ( $\pm 4,37$ ) di intensità elevata, 23,6% ( $\pm 9,26$ ) di intensità moderata, 38,12% ( $\pm 10,87$ ) di lieve per un totale di 68,87% ( $\pm 13,56$ ), con 86,1% ( $\pm 12,49$ ) di positività citoplasmatica (Tabella 4).

Uno dei campioni era classificabile morfologicamente come *border-line* tra adenoma e carcinoma. Le sue positività sono risultate, infatti, inferiori rispetto alla media del gruppo con l'1% di nuclei intensi, il 15% di medi e il 35% di lievi, con più del 50% di negatività. I diametri medi erano di 4,75 mm ( $\pm 3,56$ ).

Con valori medi compresi tra 68% e il 69%, le cellule luminali dei carcinomi di grado I canini si sono dimostrate simili a quelli felini e ai carcinomi complessi, con i quali condividevano il valore del grado. I carcinomi duttali e quelli con il mioepitelioma maligno possedevano, invece delle positività più ambigue e discontinue.

L'ultimo gruppo, quello dei carcinomi di grado III canini (Figura 14), è risultato con il 18,14% ( $\pm 3,6$ ) di nuclei intensi positivi, 39% ( $\pm 3,2$ ) di moderati, 37,57% ( $\pm 2,19$ ) di lievi per un totale di 94,7% ( $\pm 3,73$ ) di positività nucleare media. I diametri medi erano di 11,14 mm ( $\pm 8,09$ ) (Tabella 4).

Le percentuali per ogni singolo tumore sono riportate in Appendice IV.

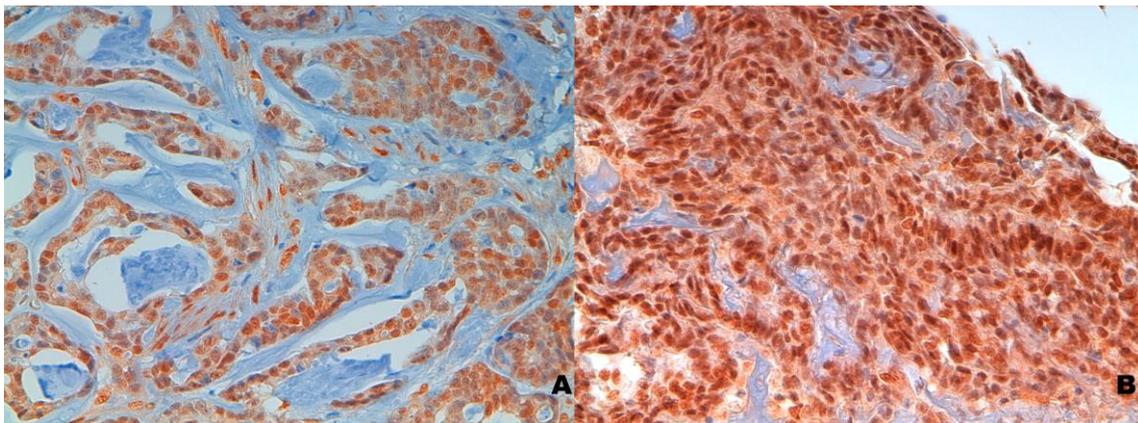


Figura 14 Espressione immunoistochimica per YAP/TAZ. A: cane, carcinoma mammario tubulare semplice di grado I (40X). B: cane, carcinoma mammario tubulare semplice di grado III (40X).

**Tabella 4.** Sono riassunte le medie e le deviazioni standard del diametro tumorale e delle percentuali delle positività per YAP/TAZ per raggruppamento tumorale.

Specie	Gruppo	Numero Campioni	Diametro (mm)	% TOT <sub>L</sub>	% NI <sub>L</sub>	% NM <sub>L</sub>	% NL <sub>L</sub>	% NEG <sub>L</sub>	% Cyt <sub>L</sub>	% TOT <sub>M</sub>	% NI <sub>M</sub>	% NM <sub>M</sub>	% NL <sub>M</sub>	% NEG <sub>M</sub>	% Cyt <sub>M</sub>
Gatto	Carcinomi Semplici Grado I	6	9,83 ±6	69,33 ±12,42	7,67 ±3,99	19,83 ±4,91	41,83 ±9,41	30,67 ±12,42	90 ±9,79	/	/	/	/	/	/
Gatto	Carcinomi Semplici Grado III	6	12,6 ±3,44	85,5 ±16,25	21,5 ±13,07	32,83 ±13,31	31,17 ±9,35	14,5 ±16,25	85,5 ±18,1	/	/	/	/	/	/
Gatto	Carcinomi Duttali	4	6,5 ±2,69	29,75 ±5	<1 ±0	5 ±1,87	23,75 ±4,15	70,25 ±5	90 ±3,83	80 ±23,28	28,55 ±21	27,75 ±16,52	23,75 ±15,76	20 ±23,28	79 ±23,69
Cane	SCMM	7	23,86 ±9,14	81 ±42,62	10,75 9,51	26 ±18	44,25 ±23,15	19 ±17,26	83,25 ±42,74	83,57 ±9,39	15 ±9,26	25 ±9,35	44,29 ±12,5	18,57 ±11,25	86 ±9,40
Cane	CC	6	8,83 ±2,97	69,83 ±14,16	10,83 ±4,34	24 ±5,32	35 ±15,7	30,17 ±14,16	96,17 ±3,89	81 ±15,17	26,17 ±12,29	30,16 ±8,17	24,7 ±4,15	19 ±15,19	93,17 4,45
Cane	Carcinomi Semplici Grado I	8	4,75 ±3,56	68,87 ±13,56	7,1 ±4,37	23,6 ±9,26	38,12 ±10,87	31,12 ±13,56	86,1 ±12,49	/	/	/	/	/	/
Cane	Carcinomi Semplici Grado III	7	11,14 ±8,09	94,7 ±3,73	18,14 ±3,6	39 ±3,2	37,57 ±2,19	5,29 ±3,73	96,86 ±2,29	/	/	/	/	/	/

“% TOT”: percentuale positività nucleari totali. “% NI”: percentuale positività nucleari intense. “NM”: percentuale positività nucleari medie. “NL”: percentuale positività nucleari lievi. “NEG”: percentuali nuclei negativi. “Cyt”: percentuali positività citoplasma. “L” ed “M” in pedice indicano che le percentuali si riferiscono rispettivamente alle popolazioni luminali e mioepiteliali.

Per raggruppamenti, seguendo le logiche scelte per l'analisi statistica, i tumori felini hanno evidenziato una differenza notevole tra quelli di grado I, con una media totale del 53,5% di positività totale, e quelli di grado III con l'85%. Naturalmente i carcinomi duttali hanno influito notevolmente nell'insieme, abbassando al 5% i nuclei intensi, al 13,9% quelli moderati e al 34,6% i lievi; il tutto con una negatività del 46,5% e un citoplasma positivo al 91,8%.

Considerando una possibile differenza tra carcinomi semplici e complessi felini la differenza dei nuclei intensi era del 13,58%, raggiungendo il 21,33% nei moderati, il 12,75% nei lievi sempre a favore del primo gruppo. Con il 70,25% di negativi contro il 22,58% i complessi si sono dimostrati superiori.

Nel comparto canino tra semplici e complessi si sono rivelate differenze sotto l'1% in favore dei secondi per quanto concerneva le positività intense; anche i nuclei lievi, con il 40% circa a fronte del 37,87%, erano maggiori nei complessi. I nuclei moderati erano per il 7% superiori nei semplici; il citoplasma con il 91,13% nei semplici era significativamente superiore al 54,38% dei complessi.

Va inteso che queste percentuali sono cambiate nel momento in cui si è provato ad escludere il mioepitelioma maligno. I carcinomi semplici hanno manifestato il 12,27% di nuclei intensi, 30,8% di moderati, 37,87 di lievi, 91,13% di citoplasma e IML% di 80,93%; i complessi rispettivamente 10,83%, 24%, 35%, 96,17% e 69,83 a riprova della complessità della caratterizzazione del mioepitelioma maligno.

Le differenze tra grado I e III sono state molto più evidenti. Escludendo il mioepitelioma dal gruppo del grado I, è stato riportato l'8,7% di nuclei intensi, 14,36% di moderati, 36,79% di lievi, 30,71% di negativi, 90,43% il citoplasma, per un totale di positività del 69,29%. Il gruppo di terzo grado III rispettivamente aveva 18,14%, 39%, 37,57%, 5,29%, 96,86% e 94,71%. Escluse le positività lievi, in cui non si è vista una sostanziale differenza tra i due, il grado III ha manifestato una presenza di YAP/TAZ intranucleari considerevolmente superiore sotto ogni aspetto.

#### **4.4 Western Blot**

Sei campioni sono stati utilizzati per l'analisi tramite Western blot: due casi di carcinoma di donna (triplo-negativo) che fungevano anche da controlli positivi, due di gatto e due di cane. Una donna di 50 anni aveva un nodulo a livello della mammella sinistra, quadrante centrale, di circa 1,2 cm, mentre la seconda di 45 anni, un nodulo di

1 cm nel quadrante sinistro, mammella sinistra. Le due femmine di gatto comune europeo erano sterilizzate; la prima, di 6 anni, aveva un nodulo lungo la linea mammaria di destra, la seconda, di 11, due noduli a livello di mammella toracica craniale e caudale destra. Alla femmina intera di dalmata (13 anni), invece, era stata rilevata una massa di 8 cm che occupava la mammella inguinale e si estendeva cranialmente fino a quelle addominali, ma non ci è stato dato sapere se a sinistra o a destra. Una femmina di meticcio, intera di 15 anni, era stata portata a visita per un nodulo di circa 3 cm a livello della linea mammaria sinistra, associata ad una neoformazione cutanea verrucoide.

Dei quattro campioni animali utilizzati per la western blot, una della gatte ha presentato un carcinoma tubulare di grado II, mentre la seconda un carcinoma semplice di grado II associato ad un carcinoma duttale di grado I ed ectasia duttale cistica. La femmina di dalmata ha presentato reperti istopatologici compatibili con un carcinoma semplice con mioepitelioma maligno, un carcinoma complesso di grado I ed un osteosarcoma con aree di iperplasia lobulare; il linfonodo presentava iperplasia follicolare e istiocitosi dei seni con invasione linfonodale di cellule neoplastiche. L'ultima femmina presentava un carcinoma solido di grado II, un carcinoma tubulare di grado II, un carcinoma complesso di grado I e linfoadenopatia iperplastica reattiva; vi era, infine, una lieve iperplasia sebacea associata alla cute.

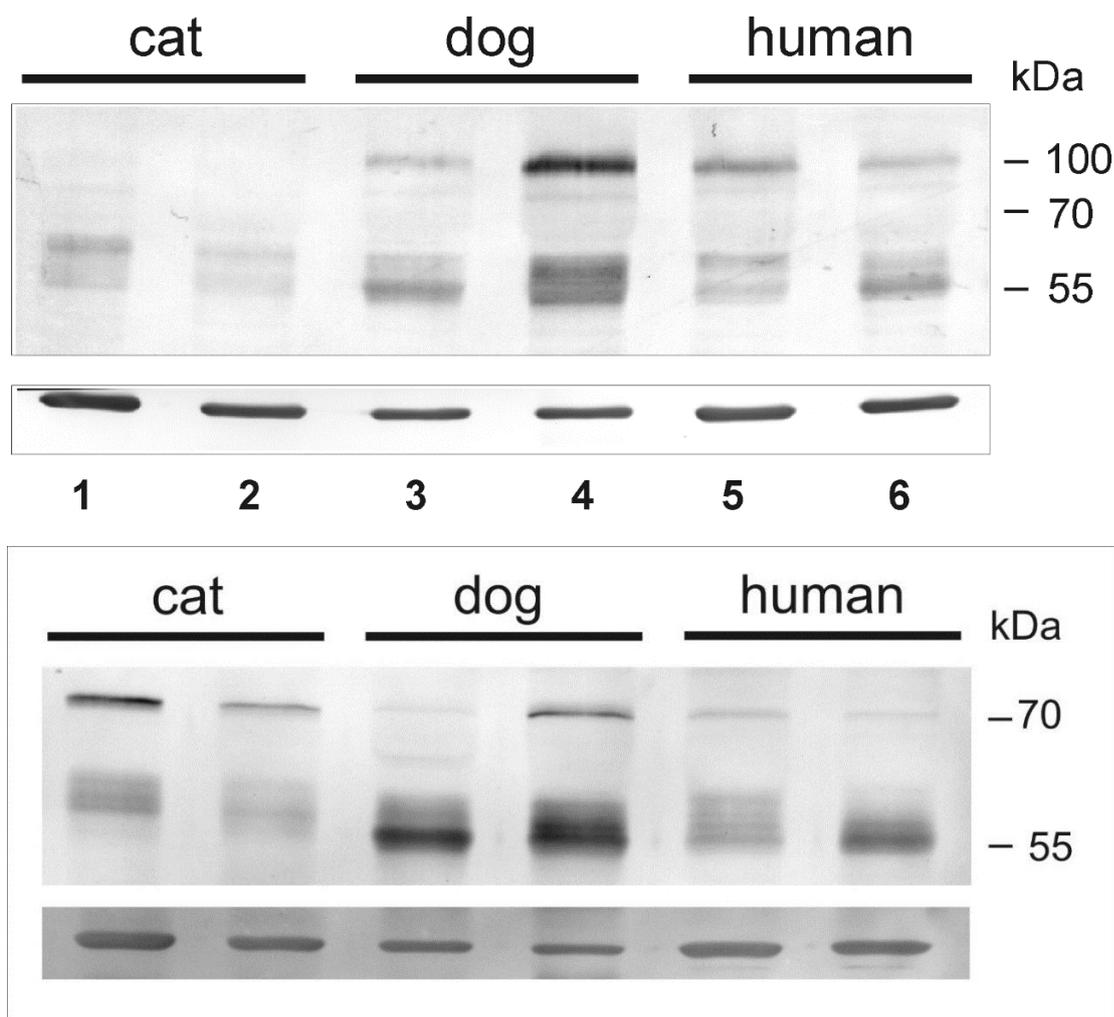


Figura 15 Sono visibili i risultati delle due analisi tramite western blot, eseguite in tempi diversi. Alla prima è seguita, infatti, una seconda con maggiore risoluzione del gel. Il controllo positivo  $\beta$ -actina è visibile appena sotto il riquadro dei risultati. Cat: gatto; Dog: cane; Human: donna; KDa: Chilodalton.

L'espressione di YAP/TAZ è stata analizzata tramite western blot e i rispettivi pesi molecolari di 70KDa per il primo e 55KDa per il secondo sono stati rilevati in tutti i campioni. I due cani hanno mostrato chiaramente due bande di elevata intensità a 55 KDa, presentando soprattutto la forma defosforilata, ma anche la forma fosforilata. Il secondo, inoltre, aveva una moderata espressione di YAP. La quantità delle proteine YAP e TAZ sono apparse leggermente diverse nei due campioni, a confronto di una uguale quantità della proteina actina. Il secondo animale, in particolare, è apparso differente rispetto al primo sulla base dell'intensità delle bande multiple sopra i 55 KDa, indicando una possibile fosforilazione maggiore della proteina (Figura 15).

I due campioni umani sembravano avere differenze più consistenti: uno con diverse bande al di sopra dei 55 KDa, che probabilmente stanno ad indicare diversi livelli di fosforilazione. Il secondo, invece, è sembrato maggiormente defosforilato, con una

banda di elevata intensità a 55KDa. In entrambi la quantità di YAP era minore rispetto a quella individuata nei campioni di tumore mammario canino (Figura 15).

I due gatti avevano bande di intensità alternate, meno visibili nel secondo, tutte di peso molecolare leggermente superiore a 55KDa, evidenziando maggiormente la presenza della forma fosforilata. La quantità di YAP era elevata soprattutto nel primo animale (Figura 15).

Questi dati sono sembrati in accordo con i risultati ottenuti tramite immunohistochimica. I due cani avevano due SCMM con 80% e 95% di nuclei positivi a livello di cellule neoplastiche. L'espressione nucleare nelle due donne era molto bassa e concentrata in determinate aree (Figura 10), ma intensamente presente a livello stromale, soprattutto nel secondo caso dove la western blot ha evidenziato bande elevate. I due gatti hanno mostrato maggiori negatività nucleari, ma moderate positività a livello delle cellule degli annessi cutanei, della membrana basale cutanea e dello stroma.

#### **4.5 Analisi statistica**

La prima fase della valutazione statistica si è limitata alla ricerca di correlazioni significative tra i vari metodi utilizzati per l'assegnazione di un punteggio alle positività nucleari per YAP/TAZ.

La prima ricerca si è basata sul test di correlazione di Pearson. Si è constatato (Tabella 5) che la somma della percentuale delle positività nucleari possedeva una correlazione diretta e quasi sempre molto forte con tutti gli altri metodi. Il coefficiente di Pearson superava sempre lo 0,79, con un livello di significatività  $P < 0,001$ . L'unica situazione in cui la correlazione era meno forte è stato con l'IRS più rappresentativo, pur rimanendo di elevata significatività.

Il diametro è apparso totalmente privo di rapporti significativi. L'H score ha manifestato corrispondenze molto forti con tutti i punteggi (sempre al di sopra dello 0,8 e fino a 0,92 con IML%) costantemente significative ( $P < 0,001$ ). Situazione simile per il Q score medio, mentre il Q score più rappresentativo si è dimostrato lievemente meno rapportabile con IRS (sia esso medio sia più rappresentativo) rispetto agli altri valori dei precedenti punteggi, ma sempre con  $P < 0,001$ . L'IRS score era forse il metodo con una correlazione diretta inferiore, ma la significatività era sempre elevata e i coefficienti non scendevano mai al di sotto dello 0,62 ( $P < 0,001$ ), rappresentante quello esistente tra

l'IRS medio stesso e il più rappresentativo. L'Allred, esclusa la correlazione media con l'IRS più rappresentativo (0,64), comunque significativa ( $P < 0,001$ ), ha correlato molto bene con tutti gli score.

Riassumendo, tramite il test di correlazione di Pearson, se si eccettua il diametro nucleare, gli altri punteggi hanno correlato benissimo tra loro, dimostrando sempre significatività ( $P < 0,001$ ). Nella tabella 5 sono riassunti i risultati, segnando in grassetto le correlazioni significative.

Concludendo ed escludendo il diametro, che non ha dimostrato nessuna correlazione significativa, tutti i metodi utilizzati per la valutazione delle positività di YAP/TAZ e quindi tutte le variabili avevano tendenza a variare in funzione l'una dell'altra.

**Tabella 5.** Test di correlazione di Pearson. Sono segnati i coefficienti di correlazione sui metodi di valutazione quantitativa dell'analisi immunohistochimica.

	<b>Diametro tumore (mm)</b>	<b>IML %</b>	<b>H score</b>	<b>Q score<sub>M</sub></b>	<b>Q score<sub>R</sub></b>	<b>IRS<sub>M</sub></b>	<b>IRS<sub>R</sub></b>	<b>Allred<sub>M</sub></b>	<b>Allred<sub>R</sub></b>
<b>Diametro tumore (mm)</b>	1.00000								
<b>IML %</b>	0.21636	1.00000							
<b>H score</b>	0.21709	<b>0.92887</b> ***	1.00000						
<b>Q score<sub>M</sub></b>	0.07036	<b>0.83896</b> ***	<b>0.81077</b> ***	1.00000					
<b>Q score<sub>R</sub></b>	0.18283	<b>0.87006</b> ***	<b>0.91344</b> ***	<b>0.80099</b> ***	1.00000				
<b>IRS<sub>M</sub></b>	0.08866	<b>0.79163</b> ***	<b>0.85092</b> ***	<b>0.70337</b> ***	<b>0.72378</b> ***	1.00000			
<b>IRS<sub>R</sub></b>	0.08788	<b>0.64387</b> ***	<b>0.80224</b> ***	<b>0.69615</b> ***	<b>0.85318</b> ***	<b>0.62109</b> ***	1.00000		
<b>Allred<sub>M</sub></b>	0.21637	<b>0.91064</b> ***	<b>0.90965</b> ***	<b>0.70958</b> ***	<b>0.77709</b> ***	<b>0.82989</b> ***	<b>0.64158</b> ***	1.00000	
<b>Allred<sub>R</sub></b>	0.14260	<b>0.83880</b> ***	<b>0.89567</b> ***	<b>0.77865</b> ***	<b>0.90999</b> ***	<b>0.70408</b> ***	<b>0.86750</b> ***	<b>0.74953</b> ***	1.00000

IML%: somma delle percentuali di positività nucleare. La "R" in pedice indica lo score più rappresentativo. La "M" in pedice indica lo score medio. Per le definizioni consultare il paragrafo materiali e metodi che tratta le definizioni dei singoli score. \* = P<0.05; \*\* = P<0.01; \*\*\* = P<0.001

I test di correlazione di Spearman e di correlazione Tau b di Kendall hanno riportato le stesse conclusioni.

Tramite test dei ranghi di Wilcoxon si è poi andati a valutare, per ognuno dei metodi di assegnazione di punteggi, la significatività per dati appaiati. L'ipotesi H0 assumeva che non vi fossero differenze tra i campioni degli appaiamenti. Le plausibilità che H0 fosse vera sono state intervallate in tabella 6 tramite colori differenti per ogni *range* probabilistico.

Le coppie prese in esame sono state in un primo tempo gatto con cane; poi, all'interno del gruppo tumori felini, sono poi stati accoppiati tumori semplici con tumori complessi e, infine, tumori di grado I con tumori di grado III. Stessa cosa nella popolazione canina (Tabella 6).



**Tabella 6.** Test dei ranghi di Wilcoxon. Vengono riportati gli score medi e le relative deviazioni standard.

Analisi Tratti		Variabili Appaiate									
		Gatto (n.16)	Cane (n.28)	Gatto				Cane			
				SC (n.12)	DC (n. 4)	Grado I (n.10)	Grado III (n.6)	Semplici (n.15)	Complessi (n.13)	Grado I (n.21)	Grado III (n.7)
Diametro (mm)		10,06 ±5,07	12 ±9,76	11,25 ±5,12	6,5 ±2,69	8,5 ±5,24	12,67 ±3,45	7,73 ±6,89	16,92 ±10,25	12,29 ±10,24	11,14 ±8,1
TAZ IHC scores	IML %	65,5 ±25,26	79,21 ±15,3	77,42 ±16,57	29,75 ±5,07	53,5 ±21,88	85,5 ±16,25	80,93 ±16,45	77,23 ±13,58	74,05 ±14,17	94,71 ±3,73
	H score	106 ±55,83	134,64 ±37,40	129,17 ±44,8	36,75 ±6,42	74,4 ±33,04	158,83 ±45,13	140,13 ±42,43	128,30 ±29,32	120,09 ±30,76	178,29 ±14,72
	Q <sub>m</sub>	3,43 ±0,36	3,5 ±0,25	3,55 ±0,33	3,07 ±1,13	3,26 ±0,26	3,72 ±0,13	3,52 ±0,23	3,48 ±0,27	3,44 ±0,26	3,7 ±0

	Q <sub>r</sub>	<b>4,37</b> ±1,45	<b>4,93</b> ±0,92	4,92 ±1,26	2,75 ±0,43	3,6 ±0,92	5,7 ±1,25	4,93 ±0,93	4,92 ±0,91	4,71 ±0,93	5,57 ±0,49
	IRS <sub>m</sub>	3,26 ±0,74	3,53 ±0,52	3,58 ±0,57	2,3 ±0	2,85 ±0,53	3,95 ±0,5	3,62 ±0,47	3,43 ±0,55	3,38 ±0,51	4 ±0
	IRS <sub>r</sub>	4,5 ±3,37	4,57 ±2,46	5,3 ±3,52	2 ±0	2,6 ±0,66	7,7 ±3,68	4,8 ±2,31	4,3 ±2,58	4 ±2,33	6,29 ±1,98
	Allred <sub>m</sub>	0,93 ±0,44	5,22 ±0,38	5,14 ±0,29	4,3 ±0	4,72 ±0,36	5,28 ±0,31	5,31 ±0,39	5,12 ±0,34	5,06 ±0,3	5,7 ±0
	Allred <sub>r</sub>	5,69 ±1,26	6,21 ±0,62	6,17 ±1,07	4,25 ±0,43	5,1 ±0,83	6,7 ±1,25	6,2 ±0,65	6,23 ±0,58	6,1 ±0,6	6,57 ±0,49

**P<0,05** **P<0,01** **P<0,001** I rettangoli colorati con diverse intensità di grigio rappresentano i diversi livelli di significatività. In grassetto nero su sfondo bianco vengono evidenziati livelli di significatività leggermente superiori al 5%. La “R” in pedice indica lo score più rappresentativo. La “M” in pedice indica lo score medio. “SC”: carcinomi semplici; “DC”: carcinomi duttali; “n.”: numero campioni; “semplici”: carcinomi semplici; “complessi”: carcinomi complessi.

Tra cane e gatto sono state rilevate differenze significative ( $0,01 < P < 0,05$ ) nell'appaiamento IML%, nell'H score ed entrambi gli Allred. Per quanto riguarda il Q score più rappresentativo il livello di significatività era con  $P=0,591$  e quindi marginalmente significativo. In ogni situazione le medie dei punteggi si sono sempre dimostrate superiori nei cani, ma va specificato che il numero di questi era considerevolmente superiore.

Nell'appaiamento semplice con duttale felini, escluso il diametro, in cui la differenza a favore dei carcinomi semplici è stata indicativa con  $0,01 < P < 0,05$ , tutti gli altri hanno rivelato una notevole differenza con maggiore positività sempre nei primi e con significatività  $P < 0,01$ , con qualche caso a cavallo dello 0,1% come nell'IRS medio ( $P < 0,015$ ) e nell'Allred medio ( $P < 0,013$ ).

Considerando il diametro i tumori di grado III, con una media di 12,67 mm ( $\pm 3,45$ ), si sono dimostrati significativamente ( $P < 0,05$ ) maggiori degli 8,5 mm ( $\pm 5,24$ ) delle neoplasie di grado I. In tutti gli otto score utilizzati la significatività è stata  $P < 0,05$ , in particolare nel Q score medio, nel caso dell'IML% e nei due Allred, mentre nei 4 rimanenti la differenza è sempre stata cospicua con  $P < 0,01$ .

Nel caso dell'appaiamento semplice/complesso canino, invece, sono state individuate difformità nelle medie dei vari punteggi in favore dei carcinomi semplici, ma queste non sono mai state significative, ben lontane dagli intervalli presi in considerazione per effettuare l'analisi statistica. Il diametro tumorale è risultato notevolmente superiore ( $16,92 \pm 10,25$  mm contro  $7,73 \pm 6,89$  mm) con  $P < 0,01$ .

Il grado I/III di cane ha invece sottolineato ancor di più, la significatività delle diverse positività per YAP/TAZ, escluso il diametro. Il Q score e l'Allred più rappresentativi sono stati mediamente superiori nel grado III con un livello di significazione  $P < 0,05$ . I due IRS e il Q score medio sono stati indicativamente maggiori ( $P < 0,01$ ) anch'essi nei carcinomi di III grado. In questo gruppo, però, l'IML%, l'H score e l'Allred medio sono sembrati chiaramente e considerevolmente significativi ( $P < 0,001$ ). In tutti gli otto metodi di attribuzione del punteggio, quindi, il grado nel cane è parso influire maggiormente nella positività a YAP/TAZ, in modo ancor più evidente rispetto al gatto.

L'IML%, l'H score e i due Allred sono sembrati i metodi che hanno mostrato maggiore significatività considerando i cinque appaiamenti *in toto*.

In ogni caso va rimarcato il fatto che sussisteva ambiguità nella categorizzazione dei carcinomi complessi canini. Come precedentemente riportato, era stato scelto di

valutare statisticamente la popolazione mioepiteliale, in quanto questa spesso sovrastava o cancellava la seconda. Si è deciso, in un secondo momento, di effettuare nuovamente il test di Wilcoxon per l'appaiamento grado I/III di cane, escludendo gli SCMM, per analizzare eventuali cambiamenti nella differenza tra medie e la relativa significazione. Il tentativo ha rivelato un aumento delle differenze e un conseguenziale aumento della significatività in quasi tutti gli score a favore dell'esclusione del mioepitelio, escluso l'IRS medio in cui  $P < 0,0047$  era lievemente superiore a  $P < 0,0041$ . In ogni caso il mioepitelio influiva sul risultato finale in sette valutazioni su otto.

Si è poi proceduto con un'ulteriore prova non parametrica, ricorrendo al test di confronto multiplo o tra più gruppi di Kruskal-Wallis.

Si è partiti dalla popolazione felina, utilizzando come variabili il diametro dei carcinomi di grado I, di grado III e duttali. Considerando che il *p-value* calcolato era superiore al livello di significazione della soglia  $\alpha = 0.05$ , non era possibile rifiutare l'ipotesi nulla  $H_0$ . Il rischio di rifiutare  $H_0$ , nonostante fosse vera, era del 10,10%. Tramite comparazioni multiple a coppie utilizzando la procedura di Dunn / Test bilaterale non è risultato nulla di significativo per i diametri.

Spostando l'attenzione all'IML% delle tre variabili feline, il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla  $H_0$ , mentre era vera, era inferiore a 0,90%. Nel test di comparazioni multiple di Dunn sono risultate indicative ( $P < 0,002$ ) le comparazioni tra IML duttale e IML semplice di grado III. Stessa cosa per l'H score, con lievi variazioni della percentuale di rischio (0,59%) e significatività ( $P < 0,001$ ). Il Q score medio e il più rappresentativo, l'IRS medio e più rappresentativo e i due Allred hanno riportato la stessa comparazione evidenziata per l'H score, naturalmente con lievi variazioni percentuali e probabilistiche, ma interpretabili nello stesso modo.

Si è vista, quindi, nei gatti, una differenza significativa in tutti gli otto punteggi per quel che riguardava i carcinomi duttali e i carcinomi semplici di grado III.

Nella popolazione canina le variabili erano quattro, per ogni punteggio e per il diametro: SCMM, carcinoma complesso, semplice di grado I e semplice di grado III. Nello studio del diametro il rischio di rifiutare  $H_0$  era dello 0,17%, mentre la differenza rilevante tra semplice di grado I e SCMM era  $P < 0,0001$ .

Per l'IML% il rischio era dello 0,12% e differenze significative ( $P < 0,0001$ ) sono state notate tra semplice di grado III sia con i carcinomi complessi sia con i carcinomi semplici di grado I. Situazione simile ha evidenziato l'H score con rischio dello 0,31%,  $P < 0,005$  tra grado III e carcinomi complessi e  $P < 0,0004$  tra grado III e carcinomi

semplici di grado I. Lievemente dissimile il Q score medio con un rischio del 6,27%, non accettabile, ma presentava differenze significative ( $P < 0,008$ ) tra semplice di grado III e semplice di grado I. Procedendo con gli altri punteggi è possibile affermare che, escluse le tre situazioni in cui sono state evidenziate differenze significative tra grado III e carcinoma complesso (IML%, H score e Alred medio), è risultato più chiaro un lasco tra grado III e I, considerevole in tutti i punteggi escluso L'IRS medio e l'Allred più rappresentativo.

## 5 DISCUSSIONE

I campioni di tumore mammario di cane e gatto selezionati per questo lavoro di tesi erano in origine 49, ripartiti in 7 tipologie tumorali sulla base della valutazione istologica. Alla fine delle prime processazioni immunoistochimiche si è preferito eliminarne 5 a causa di artefatti tecnici. Questo ha messo in luce come sia gli aspetti pre-analitici sia quelli analitici possano inficiare e condizionare i risultati immunistochimici, che pertanto devono essere valutati accuratamente e in modo standardizzato al fine di ottenere risultati robusti e ripetibili (Peña *et al.*, 2014). Sono stati, quindi, analizzati i 44 casi rimanenti.

È ormai riconosciuto da molti autori che l'immunoistochimica comporta, talvolta, delle difficoltà interpretative date dal fatto che problemi di standardizzazione dell'intero complesso sono di continua presentazione. Tra i principali vanno ricordati, ancor prima dell'arrivo in laboratorio, il tipo di fissativo utilizzato, la durata della fissazione e, soprattutto, il rapporto tessuto/fissativo. Anche la scelta dello smascheramento antigenico deve essere presa in considerazione; se inadeguato, infatti, può comportare lo sviluppo di falsi positivi e/o negativi. L'anticorpo primario, inoltre, potrebbe essere caratterizzato da scarsa sensibilità, specificità, diluizione non ottimale o un tempo di incubazione insufficiente. Il sistema di rilevazione potrebbe anch'esso avere scarsa sensibilità, oppure essere incapace di inibire determinate attività enzimatiche endogene (non a caso si usano sistemi biotina-free). Persino la scelta del cromogeno potrebbe non essere perfetta. Ulteriormente, poichè il macchinario utilizzato è semiautomatico, reagenti, tempi di incubazione e temperature sono limitati e, ovviamente, manca di standardizzazione dei protocolli, ovvero si possono verificare delle difficoltà nella gestione e nella correzione di casi limite o speciali. Per ultimi, ma non per questo meno importanti, vanno considerati anche gli errori dettati da inesperienza.

In aggiunta a ciò, in questo lavoro, è stata evidenziata una perdita di positività nelle aree circostanti delle porzioni necrotiche dei tumori (in particolare nei carcinomi di grado III), ulteriore elemento che, per quanto di difficile quantificazione, può inficiare i risultati; tali aree, pertanto, non sono state considerate nelle analisi semiquantitative.

L'importanza dell'immunoistochimica rimane, tuttavia, fondamentale in ambito medico. Permette di chiarire la natura di strutture cellulari quando non basta la normale analisi morfologica e, ancora più importante, permette di “personalizzare” la diagnosi,

la prognosi e conseguentemente la terapia su scala economicamente accettabile e con tempistiche e tecnicismi ragionevoli (Ramos-Vara *et al.*, 2008). La diagnosi differenziale tra neoplasie di diversa istogenesi, la migliore caratterizzazione di neoplasie appartenenti allo stesso gruppo e l'identificazione di una metastasi in caso di neoplasia occulta tramite marcatori tessuto-specifici sono solo alcuni dei vantaggi che l'immunoistochimica porta allo studio dei tumori mammari (I-Tien Y e Mies C, 2008).

Nelle popolazioni prese in considerazione per questo studio, l'età media elevata (11,94 anni per i gatti e 10,81 per i cani) ha confermato che la neoplasia mammaria negli animali d'affezione rappresenta generalmente una patologia dell'età adulta, per quanto non si possa escludere a priori che anche animali più giovani sviluppino la malattia, come nel caso della gatta soriana di 7 anni (Hughes *et al.*, 2012; Midsorp *et al.*, 1991; Pérez-Alenza *et al.*, 2000; Sorenmo *et al.*, 2009; Weijer *et al.*, 1993). Il numero di campioni presi in esame, e la mancanza di accurati dati epidemiologici, non era tuttavia sufficiente per un'analisi obiettiva sulle incidenze/prevalenze tumorali all'interno di una particolare razza o specie. Soprattutto negli animali domestici risulterebbe difficile esprimersi, poichè la loro distribuzione territoriale è subordinata a convenzioni e tendenze sociali che spingono l'acquisto da parte dei proprietari di determinati morfotipi. A questo è importante aggiungere, inoltre, che la compilazione delle schede anamnestiche era spesso insufficiente e contraddittoria e se ne deduce che qualsiasi considerazione sull'età di insorgenza dei tumori o su altri dati anamnestici, come quelli relativi alla possibile data di sterilizzazione, non possono essere considerati a fini epidemiologici/statistici. Infine, non sempre ad una presa visione da parte del proprietario di una lesione mammaria sul proprio animale corrisponde una rapida e consequenziale visita presso un veterinario; molte volte, pertanto, il paziente arriva in un ambulatorio con lesioni presenti da tempo indeterminato.

Per quanto concerne le analisi immunoistochimiche, i risultati relativi ai campioni di tessuto non tumorale hanno apparentemente confermato che YAP/TAZ sono presenti in forma attiva a livello nucleare nelle cellule basali della ghiandola mammaria (generalmente non ancora ben differenziate) e, analogamente, anche a livello citoplasmatico, seppur in forma fosforilata e quindi inattiva. A sostegno di questo, è importante ricordare che le cellule basali/mioepiteliali mammarie umane e animali possiedono la capacità di autorinnovarsi, proliferando e differenziandosi continuamente al fine di rimpiazzare quelle invecchiate o morte (Clarke *et al.*, 2005). È possibile,

quindi, che la loro maggiore positività a YAP/TAZ sia legata a questa loro peculiare caratteristica, che le obbliga ad una continua attività e *turn over*.

Analoga al tessuto sano, l'evidente positività nucleare con intensità variabile al grado di differenziazione è stata evidenziata anche a livello cutaneo, nello strato basale dell'epidermide, dei follicoli e delle ghiandole, attestando il ruolo di YAP/TAZ (soprattutto di YAP) nel turnover epiteliale (Lee *et al.*, 2014).

La forte presenza di positività stromale, endoteliale, e anche in altre componenti mesenchimali, ha convalidato l'idea che YAP/TAZ possano avere molta influenza nel rimodellamento e nella crescita mesenchimale (Piccolo *et al.*, 2013). Dupont e colleghi (2011), ad esempio, hanno indicato che YAP/TAZ possono essere modulati attraverso stimoli meccanici quali lo stiramento, la compressione o il rimodellamento della matrice extracellulare.

Per quanto concerne i carcinomi felini, la positività nucleare luminale, moderata o scarsa, ha presentato un incremento, significativo in tutti gli otto score utilizzati, nei carcinomi di grado III rispetto a quelli di grado I, con l'85,5% di positività totali e il 21,5% di cellule con positività intense, a fronte del 69,3% dei nuclei totali positivi nei carcinomi di grado I. Anche il diametro si è dimostrato maggiore nei primi in modo significativo ( $P < 0,05$ ).

I carcinomi duttali felini, con il 29,75% di positività nucleari luminali totali, hanno evidenziato un comportamento simile ai tumori semplici dello stesso basso grado. Questa prima parte di risultati ha pertanto suggerito, come già descritto nel tumore al seno della donna (Cordenosi *et al.*, 2011), che l'elevata espressione di YAP/TAZ nei nuclei di cellule tumorali si associa a un grado elevato e un comportamento aggressivo.

Nei carcinomi duttali felini, rispetto alla popolazione luminale, la componente basale/mioepiteliale ha mostrato un'interessante positività nucleare, arrivando al 60% di nuclei intensi in un particolare caso. L'analisi statistica ha messo in evidenza, tuttavia, elevate deviazioni standard nelle medie dei nuclei con intensità moderata e lieve, indicando una notevole eterogeneità di espressione.

Le cellule basali/mioepiteliali, generalmente, appartengono al compartimento staminale della ghiandola mammaria (Moumen *et al.*, 2011). Queste cellule formano una barriera naturale, insieme alla membrana basale e allo stroma, che normalmente impedisce l'invasione tumorale (Adriance *et al.*, 2005; Deugnier *et al.*, 2002); possono, inoltre, andare incontro ad apoptosi, rilasciare fattori inibenti la crescita, bloccare l'angiogenesi e la degradazione della membrana basale e, pertanto, alcuni autori

ritengono che svolgano una funzione “oncosoppressiva”, quando non sono in trasformazione maligna (Adriance *et al.*, 2005; Deugnier *et al.*, 2002). È stato dimostrato, in aggiunta, che possono modulare l'espressione genica sia della cellula tumorale sia dei fibroblasti antagonizzandone le possibili interazioni (Jones *et al.*, 2003).

I carcinomi duttali felini manifestano un comportamento meno aggressivo e sono dotati di una componente basale che non entra nella normale differenziazione mioepiteliale visibile generalmente nei tumori di cane, nei quali presenta anche un'espressione nucleare di  $\beta$ -catenina (Zappulli *et al.*, 2012). Alla luce di questi dati e dei risultati qui ottenuti, quindi, è possibile ipotizzare che nei carcinomi duttali, l'attività di YAP/TAZ, visibile a livello basale, possa conferire un fenotipo indifferenziato alle cellule di queste neoplasie feline e determinarne una maggior proliferazione cellulare al fine di amplificarne il ruolo oncosoppressore, che sembrerebbe richiedere un continuo *turn over*.

Il microambiente tumorale produce notevoli effetti sulla progressione neoplastica. Fattori paracrini come ad esempio le proteine extracellulari, gli inibitori di proteasi, fattori di crescita, e regolatori dell'angiogenesi secreti dal mioepitelio, svolgono molte funzioni nei confronti della popolazione epiteliale luminale (Gudjonsson *et al.*, 2002). Tale regolazione è di fondamentale importanza per il comportamento del tumore e può essere mediata dalla matrice extracellulare o altre popolazioni cellulari (Gudjonsson *et al.*, 2002). La comparazione tra le cellule mioepiteliali derivanti dal normale tessuto mammario con quelle che contornano i carcinomi duttali della donna ha mostrato differenze nell'espressione genetica (Allinen *et al.*, 2004). Ad oggi è accettato da tutti gli autori il fatto che il carcinoma al seno della donna, similmente a quanto accade nel 80-90% dei carcinomi felini, mostri un aumento vertiginoso del rapporto cellule epiteliali/mioepiteliali e che nelle ultime fasi di sviluppo tumorale le seconde scompaiano del tutto (Rudland *et al.*, 1987). È possibile, quindi, che le cellule mioepiteliali vengano degradate a causa della sovrapproduzione di enzimi digestivi da esse stesse compiuta, o che vengano eliminate per via apoptotica; alternativamente le cellule staminali mammarie risidenti *in loco* potrebbero smettere di differenziarsi in mioepiteliali. In ogni caso, con la loro scomparsa, il tumore non trova più freno e acquisisce aggressività (Li *et al.*, 1994; Tobacman *et al.*, 1997).

In riferimento ai tumori a doppia popolazione canini, i carcinomi semplici con mioepitelioma maligno e i carcinomi complessi hanno mostrato molte similitudini.

Queste due forme neoplastiche sono tipiche del cane. La prima mostra un mioepitelio maligno in associazione alla componente tubulare epiteliale (luminale), nella seconda, invece, il mioepitelio si presenta espanso nell'interstizio con una morfologia tipicamente fusata e stellata (Goldschmidt *et al.*, 2011). In questo secondo caso, il mioepitelio viene ritenuto protettivo nei confronti dell'invasione e dell'aggressività del tumore stesso (Misdorp *et al.*, 1999). Non è stato possibile confrontare le positività nucleari delle cellule luminali in quanto, nei carcinomi semplici con mioepitelioma maligno, spesso il mioepitelio aveva quantitativamente sovrastato i tubuli del carcinoma, rendendoli oggettivamente difficili da valutare; risulterebbe pretenzioso, quindi, comparare questa popolazione nelle due diverse categorie.

Nelle due forme tumorali il mioepitelio ha presentato sempre elevati valori di positività per YAP/TAZ, curiosamente molto simili tra maligno e ben differenziato, senza presentare difformità indicative. L'83% di positività nucleari totali dei carcinomi con mioepitelioma maligno era, infatti, di poco superiore all'81% dei carcinomi complessi, per quanto quest'ultimi avessero delle positività intense e moderate maggiori (rispettivamente 26% contro 15% e 30% contro 25%). Le percentuali dei nuclei lievemente positivi erano, invece, a favore dei carcinomi semplici con mioepitelioma maligno, rilevando una popolazione leggermente più aggressiva, ma più omogenea e costante nell'espressione YAP/TAZ, la quale è stata quindi confermata anche nel compartimento basale/mioepiteliale del cane, contribuendo a supportare un ruolo delle proteine studiate nelle cellule basali in cui si accentua un'attività proliferativa e/o un fenotipo aggressivo (Allinen *et al.*, 2004).

Da questa seconda parte di dati e alla luce di quanto riportato in letteratura, si è pertanto potuto constatare che la componente basale/mioepiteliale è sempre positiva per YAP/TAZ nel gatto e nel cane, nei tessuti sani e in quelli tumorali, quando dotata di fenotipo basale/mioepiteliale e quando di fenotipo maligno. Ciò avvalga un ruolo del *pathway* in questa componente che, tuttavia, sembra avere comportamenti diversi nelle diverse specie, suggerendo, di conseguenza, una peculiare regolazione con l'implicazione di altri meccanismi e molecole.

La componente luminale dei carcinomi complessi mostrava un fenotipo ben differenziato (grado I) e ha manifestato percentuali di espressione (69,8% di IML%) simili ai carcinomi semplici del cane (68,9% di IML%), suggerendo, in questo caso, che la presenza del mioepitelio non influenzi in nessun modo l'espressione di YAP/TAZ nell'epitelio luminale.

L'analisi sui carcinomi semplici canini di grado III ha confermato risultati simili a quanto già visto con quelli felini, ovvero un'elevata presenza di YAP/TAZ rispetto ai carcinomi di grado I, con il 18,14% ( $\pm 3,6$ ) di nuclei intensi positivi, 39% ( $\pm 3,2$ ) di moderati, 37,57% ( $\pm 2,19$ ) di lievi per un totale di 94,7% ( $\pm 3,73$ ) di positività nucleare media. Le positività nucleari luminali di questa tipologia tumorale hanno espresso una bassissima deviazione standard e un'omogeneità di risultati che negli altri casi, soprattutto rispetto ai carcinomi a doppia popolazione, non è stata rilevata.

L'analisi statistica svolta ha apportato significatività ad alcune osservazioni. Innanzitutto i test di Pearson, Spearman e Tau b di Kendall hanno messo in risalto elevate ed interessanti dipendenze tra le diverse variabili, dimostrando come questi score siano tutti fortemente correlabili tra loro. Tale dato conferma che nella valutazione immunoistochimica è opportuno indicare sempre il metodo utilizzato e che la scelta di uno o due soli sistemi universalmente accettati permetterebbe maggior confronto e valorizzazione tra diversi lavori e risultati, come di recente suggerito da Peña e colleghi (2014).

Tramite test dei ranghi di Wilcoxon si è potuto evidenziare un'apparente maggiore espressione nei tumori di cane rispetto a quelli di gatto, anche se solo per quattro score. Tale differenza, per quanto probabilmente condizionata dalla numerosità dei campioni (cani 28, gatti 16), necessita in ogni caso di ulteriori approfondimenti. Certamente la presenza dei mioepiteliomi maligni nel cane potrebbe avere condizionato questo risultato.

L'appaiamento tra tumori semplici e tumori duttali nel gatto è stato probabilmente viziato dalla scarsità di campioni di tumori duttali analizzati, per quanto si sia sempre evidenziata, nei primi, una maggiore e significativa positività.

I tumori di grado III nel gatto sono parsi maggiormente positivi per YAP/TAZ rispetto ai tumori di grado I, con significatività statistica in tutti ed otto i sistemi di scoring utilizzati. Anche la media dei diametri di 12,67 mm ( $\pm 3,45$ ) dei carcinomi di grado III si è dimostrata significativamente ( $P < 0,05$ ) maggiore rispetto agli 8,5 mm ( $\pm 5,24$ ) delle neoplasie di grado I. In tutti gli otto score utilizzati la significatività è stata con  $P < 0,05$  nel Q score medio, nell'IML% e nei due Allred, mentre nei 4 rimanenti la disuguaglianza è sempre stata elevata con  $P < 0,01$ . Nel caso dell'appaiamento semplice/complesso canino, invece, sono state individuate differenze nelle medie dei vari punteggi in favore dei carcinomi semplici, ma queste non sono mai risultate

significative. Il diametro tumorale è risultato notevolmente superiore nei carcinomi semplici rispetto ai complessi ( $16,92 \pm 10,25$  mm contro  $7,73 \pm 6,89$  mm) con  $P < 0,01$ .

Per comprendere più a fondo i risultati ottenuti riguardo la popolazione canina, va rimarcato il fatto in questo gruppo si è scelto di valutare statisticamente la popolazione mioepiteliale dei carcinomi semplici con mioepitelioma maligno. Escludendo quest'ultimi si è visto un aumento delle differenze di positività per YAP/TAZ in favore dei carcinomi di grado III. Tali variazioni hanno suggerito che la classificazione tumorale in fase di selezione dei campioni e il loro raggruppamento siano fondamentali per la correttezza delle analisi successive; la valutazione morfologica e la distinzione in sottotipi può influire notevolmente sui risultati, come già evidenziato in altri lavori (Mainenti *et al.*, 2014).

L'IML%, l'H score e i due Allred sono sembrati i metodi che hanno mostrato maggiore significatività, considerando i cinque appaiamenti *in toto*. L'Allred è già stato indicato come un buon sistema di scoring da altri autori (Pena *et al.*, 2014). Per quanto ottimamente correlati tra loro nelle analisi di differenze tra gruppi, la significatività statistica ha mostrato importanti variazioni, tali da suggerire che un solo metodo di attribuzione per i punteggi potrebbe non essere sufficiente per una valutazione completa e oggettiva. Il Q score è parso quello dotato di minore sensibilità nel valutare lievi differenze di positività. Infine, ricordando che tre degli score utilizzati sono stati scomposti in due sottotipi a causa della mancanza in letteratura di chiari e accettati riferimenti su come debbano essere calcolati, quello medio è parso maggiormente significativo rispetto al più rappresentativo, soprattutto per l'Allred score.

Detto ciò, attualmente sembra di fondamentale importanza, in immunoistochimica, utilizzare almeno due metodi di attribuzione del punteggio per garantire una corretta analisi dei risultati ottenuti, possibilmente includendo sempre l'H score e l'Allred medio, che sono parsi molto sensibili e specifici.

Un'ulteriore prova non parametrica utilizzata, ovvero il test di confronto multiplo o tra più gruppi di Kruskal-Wallis, ha confermato i risultati precedenti.

All'interno di questo lavoro di tesi è stato incluso lo studio di due carcinomi mammari umani tripli-negativi con lo scopo di fungere da controlli positivi, essendo l'anticorpo primario utilizzato un *rabbit anti-human Taz*. I due tumori mammari umani hanno presentato una situazione di espressione nucleare molto ridotta. Secondo Cordenonsi e colleghi (2011), TAZ dovrebbe conferire proprietà biologiche staminali e quindi di aggressività alla neoplasia. I tumori tripli negativi mostrano solitamente queste

caratteristiche. È possibile che la minore presenza di YAP/TAZ a livello della popolazione anormale epiteliale nei nostri casi, sia, tuttavia, una conseguenza dettata dalla natura biologica enormemente eterogenea del carcinoma triplo negativo. Negli ultimi anni si è visto, infatti, come questa eterogeneità sia una possibile conseguenza di differenti espressioni genetiche, che portano alla formazione di diversi cloni cellulari a differenti stadi di differenziazione (McDermott e Wicha, 2010; Visvader, 2009; Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001). I tumori tripli negativi sono stati, di conseguenza, sottoclassificati ulteriormente in Claudin-low e Basal-like. Si ritiene che le cellule staminali mammarie possano rappresentare le cellule di origine di entrambi, con i Claudin-low bloccati in uno stato staminale che mima le caratteristiche delle MaSCs, mentre ai progenitori luminali dei basal-like è impedita solo la differenziazione terminale (Lim *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2009; Prat *et al.*, 2009). I tumori Claudin-Low sono caratterizzati da una bassa espressione di geni connessi alle giunzioni cellulari e dei marcatori di differenziazione luminale, ma possiedono una elevata quantità di *marker* associati alle cellule staminali. Mancano, inoltre, dell'espressione di geni associati alla proliferazione; ciò li identifica come neoplasie dal ciclo cellulare lento, contrariamente ai Basal-like, che però non dimostrano un comportamento mesenchimale o staminale significativo (Prat *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2009). I tumori tripli-negativi da noi utilizzati dovrebbero, quindi, essere ulteriormente caratterizzati. È possibile che se appartenessero al gruppo dei Claudin-Low, avendo un lento potenziale replicativo, non abbiano ancora attivato espressioni geniche legate alla proliferazione e questo spiegherebbe la loro bassa positività per YAP/TAZ nelle cellule neoplastiche.

L'analisi in western blot ha messo in evidenza alcuni particolari già visti tramite l'immunoistochimica. L'anticorpo utilizzato riconosce il dominio WW presente sia in TAZ che in YAP ed è, pertanto, in grado di riconoscere entrambe le proteine. Avendo quest'ultime un diverso peso molecolare, questa metodica ha permesso di evidenziare sia la presenza di TAZ che di YAP nei nostri estratti proteici di tumore mammario e di distinguerli, cosa impossibile con l'immunoistochimica.

Negli estratti proteici ottenuti dai tessuti di carcinoma di donna, di cane e di gatto si sono ottenute bande attese simili, confermando quindi la specificità e la cross-reattività interspecifica dell'anticorpo stesso.

È stata notata la presenza di una banda alta a livello dei 100 kDa. Si consideri che normalmente la forma fosforilata di YAP/TAZ comporta il loro sequestro a livello di citoplasma attraverso l'interazione con proteine 14-3-3 (Zhao *et al.*, 2007). Queste

proteine hanno normalmente un peso molecolare di 30 Kda circa. È possibile, quindi, ipotizzare che la banda di 100kDa sia un complesso di legame tra YAP e le proteine 14-3-3. Ad oggi, tuttavia, non sono state date spiegazioni definitive sulla natura di questa banda, ritrovata anche da altri autori (Kanai *et al.*, 2000; Cordenonsi *et al.*, 2011)).

In merito a possibili relazioni tra i risultati ottenuti tramite immunoistochimica e western blot, è importante puntualizzare che il confronto, in questo particolare studio, non è di semplice attuazione. In tutte le IHC, YAP/TAZ sono presenti anche a livello di stroma, di cellule basali nelle iperplasie, di cellule endoteliali e di cellule basali cutanee, il che potrebbe rendere positivo il western blot anche se non ci fosse il corrispettivo nelle cellule epiteliali tumorali luminali. Sarebbe, quindi, importante, per questo tipo di analisi, utilizzare campioni omogenei, eliminando quanto più possibile cute e tessuto circostante, estraendo dalle sole cellule tumorali e, soprattutto, da una sola popolazione neoplastica di un solo determinato nodulo.

Nuovi studi, nei prossimi anni, aggiungeranno certamente nuovi tasselli alla complessità delle influenze che YAP/TAZ esercitano o subiscono nel mosaico della biologia tumorale della mammella sia nella donna sia nelle specie domestiche, permettendo di capire con maggior chiarezza le ambiguità che possono emergere in questi lavori preliminari.



## 6 CONCLUSIONE

In questo lavoro di tesi è stata studiata, per la prima volta, l'espressione di due coattivatori di fattori di trascrizione correlati, YAP e TAZ, nel tumore mammario del cane e del gatto.

È stato possibile osservare un'elevata espressione di YAP/TAZ in tutte le neoplasie analizzate, suggerendo che essi svolgano un ruolo importante nei carcinomi mammari delle specie domestiche, con caratteristiche simili a quelle identificate precedentemente nella donna, particolarmente associate alla componente basale/mioepiteliale del tessuto mamario e all'aggressività tumorale. Poiché entrambe le molecole sono legate a comportamenti staminali e associate alla resistenza nei confronti della chemioterapia, all'iniziazione tumorale e alla metastasi, gli animali domestici potrebbero trarre beneficio da una maggior comprensione delle cascate enzimatiche alla base della loro sovra-espressione; allo stesso tempo, uno studio comparato potrebbe portare notevoli vantaggi anche in medicina umana.

In questo lavoro, inoltre, è stato deciso di comparare i differenti metodi di assegnazione dei punteggi utilizzati normalmente per le analisi immunohistochimiche. Ad oggi non vi è ancora una standardizzazione accettata, per quanto proposta, in merito alla valutazione di queste, generando spesso ambiguità e incertezza riguardo il reale utilizzo dei dati ottenuti. Sebbene tutti gli score abbiano in generale ben correlato tra loro, la somma totale dei nuclei positivi (IML%), l'H score e l'Allred score medio sono parsi più significativi, con quest'ultimo *in primis*. Sarà essenziale, in un prossimo futuro, confermare eventualmente un metodo che accomuni tutti i diversi lavori scientifici basati sull'immunohistochimica, ma fino ad allora è consigliabile utilizzarne almeno due.



## APPENDICE I

### Staging delle neoplasie mammarie canine

Stage WHO originale (OWENS,1980)				Stage WHO modificato (Rutteman, 2001)*			
<b>I</b>	T <sub>1a,b,c</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>	<b>I</b>	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
<b>II</b>	T <sub>0</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>	<b>II</b>	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>1a,b,c</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>				
	T <sub>2a,b,c</sub>	N <sub>0</sub> o N <sub>1a</sub>	M <sub>0</sub>				
<b>III</b>	T <sub>3a,b,c</sub>	Qualsiasi N	M <sub>0</sub>	<b>III</b>	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
	Qualsiasi	Qualsiasi	M <sub>0</sub>				
	T	N <sub>b</sub>					
<b>IV</b>	Qualsiasi	Qualsiasi N	M <sub>1</sub>	<b>IV</b>	Qualsiasi	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T				T		
<b>V (no stage)</b>				<b>V</b>	Qualsiasi	Qualsiasi	M <sub>1</sub>
					T	N	

*\*Non include il carcinoma infiammatorio*

#### Abbreviazioni:

#### WHO originale (OWENS,1980)

T: tumore primario (a: mobile; b: adeso alla cute; c: adeso al muscolo)

- T<sub>0</sub>: non c'è evidenza di tumore
- T<sub>1</sub>: diametro maggiore < 3 cm (a,b,c)
- T<sub>2</sub>: diametro maggiore 3-5 cm (a,b,c)
- T<sub>3</sub>: diametro maggiore > 5 cm (a,b,c)
- T<sub>4</sub>: carcinoma infiammatorio di qualunque diametro

N: stato dei linfonodi regionali (a: mobile; b: adeso)

In seguito ad un esame clinico o istopatologico:

- N<sub>0</sub>: no metastasi
- N<sub>1</sub>: metastasi al linfonodo ipsilaterale (a,b)
- N<sub>2</sub>: metastasi ai linfonodi bilaterali (a,b)

M: metastasi a distanza

- M<sub>0</sub>: non riscontrate
- M<sub>1</sub>: riscontrate

#### WHO modificato (Rutteman, 2001)

T: tumore primario

- T<sub>1</sub>: diametro maggiore < 3 cm
- T<sub>2</sub>: diametro maggiore 3-5 cm
- T<sub>3</sub>: diametro maggiore > 5 cm

N: stato dei linfonodi regionali

In seguito ad esame istologico o citologico:

- N<sub>0</sub>: no metastasi
- N<sub>1</sub>: metastasi presente

M: metastasi a distanza

- M<sub>0</sub>: non riscontrate
- M<sub>1</sub>: riscontrate

## STAGING DELLE NEOPLASIE MAMMARIE FELINE

### OWENS, 1970

Stadio			
I	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
II	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
III	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub> o N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
IV	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M <sub>1</sub>

### Abbreviazioni

T: tumore primario

- T<sub>X</sub>: tumore non evidenziato
- T<sub>1</sub>: diametro tumore inferiore a 2 cm
- T<sub>2</sub>: diametro tumore compreso tra 2 e 3 cm
- T<sub>3</sub>: diametro tumore superiore a 3 cm

N: stato dei linfonodi regionali

- N<sub>0</sub>: assenza di metastasi
- N<sub>1</sub>: presenza di metastasi

M: metastasi a distanza

- M<sub>0</sub>: non riscontrate
- M<sub>1</sub>: riscontrate

## APPENDICE II

### CALCOLO DEL GRADING ISTOLOGICO NELLE NEOPLASIE MAMMARIE CANINE

#### Grading secondo Misdorp, 2002

Formazione Tubuli	Pleomorfismo Nucleare	Mitosi e Nuclei Ipercromatici per Campo a 40X	Punteggio
Marcata	Lieve	Occasionali	1
Moderata	Moderato	2-3	2
Scarsa	Marcato	>3	3

Dopo aver attribuito il punteggio da 1 a 3 per ognuna delle tre caratteristiche, sommare il tutto e verificare secondo i seguenti parametri:

Somma Punteggi	Gr ado
3-5	I
6-7	II
8-9	III

#### Grading secondo Clemente e colleghi (*Clemente et al., 2010*)

Formazione Tubuli	Pleomorfismo Nucleare	Mitosi in 10 Campi Selezionati* a 40X	Punte ggio
>75%	Lieve	0-9	1
10-75%	Moderato	9-19	2
<10%	Marcato	>19	3

\* *Campi selezionati = aree periferiche del tumore o a più intensa attività mitotica*

Dopo aver attribuito il punteggio da 1 a 3 per ognuna delle tre caratteristiche, sommare il tutto e verificare secondo i seguenti parametri:

Somma Punteggi	Gr ado
3-5	I
6-7	II
8-9	III

**CALCOLO DEL GRADING ISTOLOGICO NELLE NEOPLASIE MAMMARIE FELINE**

**Grading secondo Castagnaro e colleghi (Castagnaro *et al.*, 1998)**

<b>Formazione Tubuli</b>	<b>Pleomorfismo Nucleare</b>	<b>Mitosi in 10 Campi a 40X</b>	<b>Punteggio</b>
<b>&gt;75%</b>	Nuclei e cellule piccoli, regolari e uniformi	0-7	1
<b>10-75%</b>	Aumento moderato delle dimensioni e della variabilità	8-14	2
<b>&lt;10%</b>	Marcato aumento delle dimensioni e della variabilità	>15	3

Dopo aver attribuito il punteggio da 1 a 3 per ognuna delle tre caratteristiche, sommare il tutto e verificare secondo i seguenti parametri:

<b>Punteggio Ottenuto</b>	<b>Grado</b>	<b>Caratteristiche Istologiche</b>
<b>3-5</b>	I	Ben differenziato
<b>6-7</b>	II	Moderatamente differenziato
<b>7-9</b>	III	Scarsamente differenziato

## APPENDICE III

### CLASSIFICAZIONE NEOPLASIE MAMMARIE

Classificazione istologica WHO 1999

#### 1. Tumori maligni

- Carcinoma non infiltrante (in situ)
- Carcinoma complesso
- Carcinoma semplice
  - ✓ Carcinoma tubolopapillare
  - ✓ Carcinoma solido
  - ✓ Carcinoma anaplastico
- Tipi speciali di carcinoma
  - ✓ Carcinoma a cellule fusate (spindle cell)
  - ✓ Carcinoma a cellule squamose
  - ✓ Carcinoma mucinoso
  - ✓ Carcinoma lipid-rich
- Sarcoma
  - ✓ Fibrosarcoma
  - ✓ Osteosarcoma
  - ✓ Altri sarcomi
- Carcinosarcoma
- Carcinoma o sarcoma nei tumori benigni

#### 2. Tumori benigni

- Adenoma
  - ✓ Adenoma semplice
  - ✓ Adenoma complesso
  - ✓ Adenoma basaloide
- Fibroadenoma
  - ✓ Fibroadenoma a bassa cellularità
  - ✓ Fibroadenoma ad alta cellularità
- Tumore benigno misto
- Papilloma duttale

#### 3. Tumori non classificati

#### 4. Iperplasia/Displasia mammaria

- Iperplasia duttale
- Iperplasia lobulare
  - ✓ Iperplasia epieliale
  - ✓ Adenosi
- Cisti
- Ectasia duttale
- Fibrosi locale (fibrosclerosi)
- Ginecomastia

### **Classificazione istologica secondo Goldschmidt et al., 2011**

#### **NEOPLASIE EPITELIALI MALIGNI (CARCINOMI):**

1. *Carcinoma in situ*
2. *Carcinoma semplice*
  - Carcinoma tubulare
  - Carcinoma tubulo-papillare
  - Carcinoma cistico-papillare
  - Carcinoma cribriforme
3. *Carcinoma micro-papillare invasivo*
4. *Carcinoma solido*
5. *Carcinoma comedonico*
6. *Carcinoma anaplastico*
7. *Carcinoma in adenoma complesso/tumore misto benigno*
8. *Carcinoma complesso*
9. *Carcinoma e mioepitelioma maligno*
10. *Carcinoma misto*
11. *Carcinoma duttale*
12. *Carcinoma intraduttale-papillare*

#### **NEOPLASIE MALIGNI SPECIALI**

1. *Carcinoma a cellule squamose*
2. *Carcinoma adenosquamoso*
3. *Carcinoma mucinoso*
4. *Carcinoma con cellule ricche di lipidi*
5. *Carcinomi a cellule fusate*

- Mioepitelioma maligno
- Carcinoma squamoso a cellule fusate
- Carcinoma-variante a cellule fusate

### **NEOPLASIE MESENCHIMALI MALIGNI**

1. *Osteosarcoma*
2. *Fibrosarcoma*
3. *Condrosarcoma*
4. *Emangiosarcoma*
5. *Altri sarcomi*

### **NEOPLASIE BENIGNE**

1. *Adenoma semplice*
2. *Adenoma papillare intraduttale (papilloma duttale)*
3. *Adenoma duttale (adenoma basaloide)*
4. *Fibroadenoma*
5. *Mioepitelioma*
6. *Adenoma complesso*
7. *Tumore misto benigno*

### **IPERPLASIE/DISPLASIE**

1. *Ectasia duttale*
2. *Iperplasia lobulare (adenosi)*
  - Iperplasia lobulare classica
  - Iperplasia lobulare con attività secernente
  - Iperplasia lobulare con fibrosi
  - Iperplasia lobulare con aspetti di atipia
3. *Epiteliosi*
4. *Papillomatosi (Iperplasia duttale)*
5. *Cambiamento fibroadenomatoso*
6. *Ginecomastia*



## APPENDICE IV

*Risultati degli esami immunoistochimici dei campioni presenti nello studio. Nella prima tabella vengono riportati i risultati delle positività riscontrate all'interno della popolazione luminale/epiteliale.*

N	Specie	Class	Grade	Size (mm)	% Positività Nucleari Luminali					Cyt
					Totale	Intensi	Moderati	Lievi	Negativi	
1	Gatto	STC	I	4	70	3	18	50	29	94
2	Gatto	STC	I	15	46	5	16	25	54	85
3	Gatto	SCPC	I	7	80	10	15	55	20	99
4	Gatto	STPC	I	20	65	5	20	40	35	94
5	Gatto	SCPC	I	3	85	15	30	40	15	97
6	Gatto	STC	I	10	69	8	20	41	31	70
7	Gatto	STC	III	10	98	45	38	15	2	99
8	Gatto	SCPC	III	12	64	11	24	29	36	60
9	Gatto	STC	III	11	99	16	53	30	1	99
10	Gatto	SoC	III	20	100	20	41	39	0	100
11	Gatto	CoC	III	10	90	31	30	29	10	95
12	Gatto	SoC	III	13	62	6	11	45	38	60
13	Gatto	DC	I	10	36	1	5	30	64	98
14	Gatto	DC	I	3	27	1	6	20	73	90
15	Gatto	DC	I	8	23	1	2	20	77	92
16	Gatto	IDPC	I	5	33	1	7	25	67	99
17	Cane	SCMM	I	35	93	8	35	50	7	95
18	Cane	SCMM	I	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	Cane	SCMM	I	10	50	0	0	50	50	60
20	Cane	SCMM	I	35	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	Cane	SCMM	I	25	100	28	45	27	0	98

22	Cane	SCMM	I	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	Cane	SCMM	I	25	81	7	24	50	19	80
24	Cane	CC	I	10	39	9	25	5	61	99
25	Cane	CC	I	10	75	3	15	57	25	88
26	Cane	CC	I	6	76	15	30	31	24	99
27	Cane	CC	I	14	80	14	24	42	20	95
28	Cane	CC	I	8	70	15	20	35	30	98
29	Cane	CC	I	5	79	9	30	40	21	98
30	Cane	STC	I	3	51	1	15	35	49	60
31	Cane	STPC	I	1	73	8	20	45	27	85
32	Cane	STC	I	4	81	14	45	22	19	85
33	Cane	STC	I	5	42	2	15	25	58	90
34	Cane	STC	I	2	79	5	24	50	21	98
35	Cane	STC	I	3	75	12	30	33	25	95
36	Cane	STC	I	7	80	5	20	55	20	97
37	Cane	STC	I	13	70	10	20	40	30	99
38	Cane	SoC	III	13	97	20	42	35	3	97
39	Cane	STPC	III	5	10	25	35	40	0	100
40	Cane	SoC	III	30	95	20	35	40	5	92
41	Cane	SoC	III	5	95	18	42	35	5	98
42	Cane	SoC	III	8	96	15	41	40	4	98
43	Cane	SoC	III	9	97	14	36	37	13	96
44	Cane	SoC	III	8	93	15	42	36	7	97

*N Prog: numero progressivo; Class: classificazione; Size: diametro; Cyt: citoplasma; STC: carcinoma tubulare semplice; STPC: carcinoma tubulo-papillare; SCPC: carcinoma cistico-papillare; DC: carcinoma duttale; IDPC: carcinoma intraduttale-papillare; CoC: carcinoma comedonico; SoC: carcinoma solido; SCMM: carcinoma semplice con mioepitelioma maligno; CC: carcinoma complesso.*

Nella seguente tabella vengono riportati i risultati delle positività riscontrate all'interno della popolazione mioepiteliale. Vengono quindi elencate solo le neoplasie in cui è stata contata.

<i>Specie</i>	<i>Class</i>	% Positività Nucleari Luminali					Cyt
		Totale	Intensi	Moderati	Lievi	Negativi	
<i>Gatto</i>	DC	80	60	20	0	20	80
<i>Gatto</i>	DC	42	2	5	35	58	40
<i>Gatto</i>	DC	100	32	48	20	0	98
<i>Gatto</i>	IDPC	98	20	38	40	2	98
<i>Gane</i>	SCMM	70	10	20	40	30	70
<i>Cane</i>	SCMM	90	10	10	70	10	94
<i>Cane</i>	SCMM	75	5	20	50	25	80
<i>Cane</i>	SCMM	80	20	25	40	35	80
<i>Cane</i>	SCMM	95	35	34	26	5	95
<i>Cane</i>	SCMM	95	15	41	39	5	98
<i>Cane</i>	SCMM	80	10	25	45	20	85
<i>Cane</i>	CC	85	25	31	29	15	85
<i>Cane</i>	CC	90	50	20	20	10	90
<i>Cane</i>	CC	92	25	40	27	8	97
<i>Cane</i>	CC	94	24	40	30	6	94
<i>Cane</i>	CC	75	25	30	20	25	95
<i>Cane</i>	CC	50	8	20	22	50	98

*N Prog*: numero progressivo; *Class*: classificazione; *Cyt*: citoplasma; *DC*: carcinoma duttale; *IDPC*: carcinoma intraduttale-papillare; *SCMM*: carcinoma semplice con mioepitelioma maligno; *CC*: carcinoma complesso.



## BIBLIOGRAFIA

Adriance MC, Inman JL, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 190–7.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983–3988.

Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 2004; 6: 17–32.

Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK. A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton* 2010; 67: 545–554.

Aragona M, Panciera T, Manfrin A, Giulitti S, Michielin F, Elvassore N, Dupont S, Piccolo S. A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell* 2013; 154: 1047-1059.

Askanazy M. Die Teratome nach ihrem Bau, ihrem Verlauf, ihrer Genese und im Vergleich zum experimentellen Teratoid. *Verhandl. Deutsch. Pathol.* 1907; 11: 39–82.

Azzolin L, Zanconato F, Bresolin S, Forcato M, Basso G, Bicciato S, et al. Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell* 2012; 151: 1443–56.

Bao Y, Nakagawa K, Yang Z, Ikeda M, Withanage K, Ishigami-Yuasa M, Okuno Y, Hata S, Nishina H, Hata Y. A cellbased assay to screen stimulators of the Hippo pathway reveals the inhibitory effect of dobutamine on the YAP-dependent gene transcription. *J Biochem* 2011; 150: 199–208.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006; 444: 756–760.

Barbieri F, Wurth R, Ratto A, Campanella C, Vito G, Thellung S, Daga A, Cilli M, Ferrari A, Florio T. Isolation of stem-like cells from spontaneous feline mammary carcinomas: phenotypic characterization and tumorigenic potential. *Exp Cell Res* 2012; 318: 847–860.

Bender AP, Dorn RC, Schneider R. An epidemiological study of canine multiple primary neoplasia involving the female and male reproductive systems. *Prev Vet Med* 1984; 2: 715–731.

Borena MB, Bussche L, Burvenich C, Duchateau L, Van de Walle GR. Mammary Stem Cell Research in Veterinary Science: An Update. *Stem cells development* 2013; 0: 1-9.

Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: Integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 586–599.

Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 108–22.

Cairns J. Somatic stem cells and the kinetics of mutagenesis and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10567-70.

Callus BA, Verhagen AM, Vaux DL. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS J* 2006; 273: 4264–4276.

Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, Harrington K, Williamson P, Moeendarbary E, Charras G: Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 637–646.

Cannito S, Novo E, Compagnone A, Valfre di Bonzo L, Busletta C, Zamara E, Paternostro C, Povero D, Bandino A, Bozzo F, Cravanzola C, Bravoco V, Colombatto S and Parola M. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2267-2278.

Cao X, Pfaff SL, Gage FH. YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor. *Genes Dev* 2008; 22: 3320–3334.

Carter MR, Hornick JL, Lester S, Fletcher CD. Spindle cell (sarcomatoid) carcinoma of the breast: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 29 cases. *Am J Surg Pathol.* 2006; 30: 300–9.

Castagnaro M, Casalone C, Bozzetta E, De Maria R, Biolatti B, Caramelli M. Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas, *Journal of comparative Pathology* 1998; 119: 263-275.

Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 7–19.

Chaffer CL and Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011; 331: 1559-1564.

Chan SW, Lim CJ, Guo K, Ng CP, Lee I, Hunziker W, Zeng Q, and Hong W. A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Research* 2008; 68:2592–2598.

Chan EH, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schafer A, Nigg EA, Sillje HH. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* 2005; 24: 2076–2086.

Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997; 276: 1425–1428.

Clarke C, Sandle J, Lakhani SR. Myoepithelial cells: pathology, cell separation and markers of myoepithelial differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 3: 273–280.

Cleary MP, Grossmann ME. Minireview: obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology* 2009; 150: 2537–2542.

Clemente M, Perez-Alenza MD, Illera JC, Peña L. Histologic, immunologic and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol* 2010; 47: 265–274.

Cocola C, Anastasi P, Astigiano S, Piscitelli E, Pelucchi P, Vilardo L, Bertoli G, Beccaglia M, Veronesi MC, et al. Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumour-initiating potential. *Reprod Dom Anim* 2009; 44: 214–217.

Cohen D, Reif JS, Brodey RS, Keiser H. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res* 1974; 34: 2859–2868.

Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 2011; 147: 759–772.

Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 275–284.

Deugnier MA, Teulière J, Faraldo MM, Thiery JP, Glukhova MA. The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res* 2002; 4: 224–230.

Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009; 458: 780–783.

Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 2009; 324: 1673–1677.

Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 2007; 130: 1120–1133.

Douglas S, Micalizzi e Susan M, Farabaugh e Heide L Ford. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. Springer 2010; 15: 117-134.

Dumont N, Wilson MB, Crawford YG, Reynolds PA, Sigaroudinia M and Tlsty TD. Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 14867-14872.

Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 2011; 474: 179–183.

Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, Elvassore N e Piccolo S: Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 2011; 474: 179-185.

Dupont S, Piccolo S. A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell* 2013; 154: 1047-1059.

Ebber J D, Treisman DM, Zorniak M, Kutty RG, Clarck PA, Kuo JS: The Cancer Stem Cell Paradigm: A New Understanding of Tumor Development and Treatment. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 621–632.

Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 2010; 18: 884–901.

Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Euler H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med* 2005; 69: 109–27.

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE: Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126: 677–689.

Fata JE, Werb Z, Bissell MJ. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res.* 2004; 6: 1–11.

Fodde R, Brabletz T: Wnt/b-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current Opinion in Cell Biology* 2007; 19: 150–158.

Fodde R, Smits R, Clevers H: APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 55-67.

Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell* 2004; 116: 769–778.

Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V: Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 2008, 319:195-198.

Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol.* 2009; 11: 1287–1296.

Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI, Black MM. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Pathol* 1983; 20: 127–142.

Goldschimdt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumours. *Veterinary Pathology* 2011; 48: 117–131.

Grzeschik NA, Parsons LM, Allott ML, Harvey KF, Richardson HE. Lgl, aPKC, and Crumbs regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway through two distinct mechanisms. *Curr Biol* 2010; 20: 573–581.

Guan Y, Gerhard B, Hogge DE. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003; 101: 3142-3149.

Gudjonsson T, Ronnov-Jessen L, Villadsen R, Rank F, Bissell MJ, Williams OP. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *Journal of Cell Science* 2002; 115: 39–50.

Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 2001; 98: 2301-2307.

Hahn KA, Adams WH. Feline mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis, and treatment alternatives. *Feline Pract.* 1977; 25: 5–11.

Hahn KA, Bravo L, Avenelli JS. Feline breast carcinoma as a pathologic and therapeutic model for human breast cancer. *In Vivo.* 1994; 8: 825-828.

Halder G, Dupont S, Piccolo S. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 591–600.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.

Hao Y, Chun A, Cheung K, Rashidi B, Yang X. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J Biol Chem* 2008; 283: 5496–5509.

Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 2005; 435: 974–978.

Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005; 233: 706–20.

Hayden DW, Barnes DM, Johnson KH. Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats: a retrospective study. *Vet Pathol* 1989; 26: 104–113.

Hayes HM Jr, Milne KL, Mandell CP. Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *Vet Rec.* 1981;108: 476–479.

Hayes AA, Mooney S. Feline mammary tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1985; 15: 513-20.

Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* 2011; 332: 458–461.

Hernandez NA, Correa E, Avila EP, Vela TA, Perez VM. PAR1 is selectively over expressed in high grade breast cancer patients: a cohort study. *J Transl Med* 2009; 7: 47.

Hong Wanjin e Guan Kun-Liang: The YAP and TAZ transcription coactivators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2012; 23: 785–793.

Hovey RC, McFadden TB, Akers RM. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4: 53–68.

Huang S-MA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 2009; 461: 614–20.

Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 2005; 122: 421–34.

Hughes K, Dobson JM. Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. *Vet J.* 2012; 194(1): 19-26.

Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW: Epithelial–mesenchymal and mesenchymal–epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 2007; 213: 374-383.

Imajo M, Miyatake K, Iimura A, Miyamoto A, Nishida E. A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *EMBO J* 2012; 31(5): 1109–1122.

I-Tien Y e Mies C. Application of Immunohistochemistry to Breast Lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 349-358.

Jaiswal S, Traver D, Miyamoto T, Akashi K, Lagasse E, Weissman IL. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10002–10007.

Janmey PA, Miller RT. Mechanisms of mechanical signaling in development and disease. *J Cell Sci* 2011; 124: 9–18.

Jeselsohn R, Brown NE, Arendt L, Klebba I, Hu MG, Kuperwasser C, Hinds PW: Cyclin D1 kinase activity is required for the self-renewal of mammary stem and progenitor cells that are targets of MMTV-ErbB2 tumorigenesis. *Cancer Cell* 2010; 17: 65-76.

Jones JL, Shaw JA, Pringle JH, Walker RA. Primary breast myoepithelial cells exert an invasion-suppressor effect on breast cancer cells via paracrine down-regulation of MMP expression in fibroblasts and tumour cells. *J Pathol* 2003; 201: 562–572.

Jordan CT, Guzman ML. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. *Oncogene* 2004; 23: 7178-7187.

Jordan CT, Guzman ML, Noble M: Cancer Stem Cells. *The New England Journal of Medicine* 2006; 355: 1253-1261.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420–1428.

Kamstock DA, Fredrickson R, Ehrhart EJ. Lipid-rich carcinoma of the mammary gland in a cat. *Vet Pathol* 2005; 42: 360-362.

Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, et al. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14–3–3 and PDZ domain proteins. *Embo J* 2000; 19: 6778–6791.

Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol* 2005; 133: 246–252.

Komuro A, Nagai M, Navin NE, Sudol M. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J Biol Chem.* 2003; 278: 33334–33341.

Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 2009; 15: 195–206.

Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentferm J, Schmidt HA, Technau U, Von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ, and Holstein TW. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 2005; 433: 156–160.

Langenbach A, McManus P, Hendrick M, Shofer FS, Sorenmo KU: Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 1424–1428.

Lee MJ, Ran Byun M, Furutani-Seiki M, Hong JH, Jung HS. YAP and TAZ regulate skin wound healing. *J Invest Dermatol* 2014;134: 518-525.

Lei QY, Zhang H, Zhao B, Zha ZY, Bai F, Pei XH, Zhao S, Xiong Y, Guan KL. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 2426–2436.

Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger Wet al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009; 139: 891–906.

Li F, Strange R, Friis RR, Djonov V, Altermatt HJ, Saurer S, Niemann H, Andres AC. Expression of stromelysin-1 and TIMP-1 in the involuting mammary gland and in early invasive tumors of the mouse. *Int J Cancer* 1994; 59: 560–568.

Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell research* 2007; 17: 3–14.

Li L e Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 605–631.

Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, Hart AH, Asselin-Labat ML, Gyorki DE, Ward T, Partanen A, Feleppa F, Huschtscha LI, Thorne HJ, kConFab, Fox SB, Yan M, French JD, Brown MA, Smyth GK, Visvader JE, Lindeman GJ: Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* 2009; 15: 907-913.

Lim E, Wu D, Pal B, Bouras T, Asselin-Labat ML, Vaillant F, Yagita H, Lindeman GJ, Smyth GK, Visvader JE: Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell

subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R21.

Ling C, Zheng Y, Yin F, Yu J, Huang J, Hong Y, Wu S, Pan D. The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 10532–10537.

Lipton A. Should bisphosphonates be utilized in the adjuvant setting for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 2010; 122: 627–636.

Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee S-J, Anders RA, et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev* 2012; 26: 1300–1305.

Lou H, Dean M. Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. *Oncogene* 2007; 26: 1357–1360.

Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004; 432: 307-315.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.

MacEwen EG, Patnaik AK, Harvey HJ, Panko WB. Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Res* 1982; 42: 2255–2259.

Mainenti M, Rasotto R, Carnier P, Zappulli V. Oestrogen- $\alpha$  and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *Vet J* 2014.

Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, et al. Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *AmJ Physiol Renal Physiol* 2008; 294: 542–553.

Mammoto A, Ingber DE. Cytoskeletal control of growth and cell fate switching. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 864–870.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial–mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704-715.

Marconato L, Romanelli G, Stefanello D, Giacoboni C, Bonfanti U, Bettini G, Finotello R, Verganti S, Valenti P, Ciaramella L, Zini E: Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003–2008). *J Am Vet Med Assoc* 2009; 235: 967–972.

Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 23–38.

May Caitlin D, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA: Epithelial–Mesenchymal Transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Research* 2011; 13: 1-10.

McCoy EL, Iwanaga R, Jedlicka P, Abbey NS, Chodosh LA, Heichman KA, Welm AL, Ford HL: Six1 expands the mouse mammary epithelial stem/progenitor cell pool and induces mammary tumors that undergo epithelial–mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 2663-2677.

McDermott SP, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *Mol Oncol* 2010; 4: 404-419.

Meng A, Wang Y, Van Zant G, Zhou D. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Res* 2003; 63: 5414-5419.

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15:117–134.

Miller E, Yang J, Deran M, Wu C, Su AI, Bonamy GM, Liu J, Peters EC, Wu X. Identification of serum-derived sphingosine-1-phosphate as a small molecule regulator of YAP. *Chem Biol* 2012; 19: 955–962.

Misdorp W. Tumors of the mammary gland. *Tumors in Domestic Animals*, ed. Meuten DJ, 4th ed., pp. 575–606, 764. Iowa State Press, Ames, IA, 2002.

Misdorp W, Else RW, Hellme'n E, et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In: World Health Organization, ed. *International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals*, Seconda edizione. Vol VII Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology. 1999; 11-56.

Misdorp W, Romijn A, Hart AA. Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. *Anticancer Res.* 1991; 11:1793-1797.

Moleirinho S, Chang N, Sims AH, Tilston-L'nel AM, Angus L, Steele A, et al. KIBRA exhibits MST-independent functional regulation of the Hippo signaling pathway in mammals. *Oncogene* 2013; 32: 1821–1830.

Mongroo PS and Rustgi AK. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther* 2010; 10: 219-222.

Morin-Kensicki EM, Boone BN, Howell M, Stonebraker JR, Teed J, Alb JG, Magnuson TR, O'Neal W, Milgram SL. Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap 65. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 77–87.

Moulton JE, Taylor DO, Dorn CR, Andersen AC. Canine mammary tumors. *Vet Pathol* 1970; 7: 289–320.

Moumen M, Chiche A, Cagnet S, Petit V, Raymond K, Faraldo MM, Deugnier MA, Glukhova MA. The mammary myoepithelial cell. *Int J Dev Biol.* 2011; 55: 763-771.

Narit M e Lowe SW. Senescence comes of age. *Nat Med* 2005; 11: 920-922.

Nielsen SW. The malignancy of mammary tumors in cats. *Mod Vet Pract* 1967; 33: 245-252.

Overley B, Shofer FS, Goldschmidt MH, et al. Association between ovariohysterectomy and feline mammary carcinoma. *J Vet Intern Med* 2005; 19(4): 560–563.

Owens LN. *Classification of Tumors in Domestic Animals*, 1st ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1980.

Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, Gao F, Pan H, Manne U, Alekseyev YO, Thiagalingam A, Abdolmaleky HM, Lenburg M and Thiagalingam S. Smad signaling is required to maintain epigenetic silencing during breast cancer progression. *Cancer Res* 2010; 70: 968-978.

Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 895-902.

Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol.* 2004; 48: 365–75.

Peña L, De Andrés PJ, Clemente M, Cuesta P, Pérez-Alenza MD. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol* 2013; 50: 94-105.

Peña L, Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, Díez L, Gärtner F, Hellmén E, Kiupel M, Millán Y, Miller MA, Nguyen F, Poli A, Sarli G, Zappulli V, De las Mulas JM. Canine mammary tumours: a review and consensus of

standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2014; 51: 127-145.

Penzo C, Ross M, Muirhead R, Else E, Argyle DJ. Effect of recombinant feline interferon-omega alone and in combination with chemotherapeutic agents on putative tumour-initiating cells and daughter cells derived from canine and feline mammary tumours. *Vet Comp Oncol* 2009; 7: 222–229.

Pérez-Alenza MD, Peña L, Del Castillo N, Nieto AI. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice* 2000; 41: 287–291.

Pérez-Alenza MD, Rutteman GR, Pena L. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 132–139.

Pérez-Alenza MD, Tabanera E, Pena L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 1110–1114.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.

Polyak K, Weinberg RA: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 265-273.

Prasad CP, Mirza S, Sharma G, Prashad R, DattaGupta S, Rath G and Ralhan R. Epigenetic alterations of CDH1 and APC genes. Relationship with activation of Wnt/beta-catenin pathway in invasive ductal carcinoma of breast. *Life Sci* 2008; 83: 318-325.

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM: Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R68.

Prat A, Perou CM: Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med* 2009; 15: 842-844.

Provenzano PP, Keely PJ. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. *J Cell Sci* 2011; 124: 1195–1205.

Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 393–413.

Rasotto R, Goldschmidt MH, Castagnaro M, Carnier P, Caliani D, Zappulli V. The Dog as a Natural Animal Model for Study of the Mammary Myoepithelial Basal Cell Lineage and its Role in Mammary Carcinogenesis. *J Comp Pathol* 2014; 151: 166-180.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105–111.

Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, Von Euler H. Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res* 2009; 69: 8770-8774.

Rorth P. Collective cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009; 25: 407–429.

Rudland PS. Stem cells and the development of mammary cancers in experimental rats and in humans. *Cancer Metastasis Rev* 1987; 6: 55–83.

Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG: Tumors of the mammary gland In Small Animal Clinical Oncology, ed. SJ Withrow, EG MacEwen, 3rd ed., pp. 455–477. WB Saunders, Philadelphia, PA, 2001.

Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, Pruszek J, Rodriguez JR, Zhou D, Kreger BT, Vasioukhin V, Avruch J, Brummelkamp TR, et al. Yap1 acts downstream of a-catenin to control epidermal proliferation. *Cell* 2011; 144: 782–795.

Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst* 1969; 43: 1249–1261.

Seixas F, Palmeira C, Pires MA, et al. Mammary invasive micropapillary carcinoma in cats: clinicopathologic features and nuclear DNA content. *Vet Pathol.* 2007; 44: 842-848.

Sheng W, Wang G, La Pierre DP, Wen J, Deng Z, Wong CK, Lee DY, Yang BB. Versican mediates mesenchymal–epithelial transition. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 2009-2020.

Sherley JL. Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. *Stem cells* 2002; 20: 561–572.

Shiras A, Chettiar ST, Shepal V, Rajendran G, Prasad GR, Shastry P. Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma. *Stem Cells.* 200; 25: 1478–1489.

Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 2003; 120: 1351–1383.

Skorupski KA, Overley B, Shofer FS, et al. Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. *J Vet Intern Med.* 2005; 19: 52-55.

Soltysova A., Altanerova V., Altainer C.: Cancer stem cells. *Neoplasma* 2005; 52: 435-440.

Sonnenschein EG, Glickman LT, Goldschmidt MH, McKee LJ: Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 694–703.

Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Langeland M, Mongil CM, Grondahl AM, Teige J, Goldschmidt MH: Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol* 2009; 7: 162–172.

Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH. The development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol* 2011; 48: 85–97.

Sorger PK, Dobles M, Tournebize R, Hyman AA. Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 807–814.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 10869-10874.

Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* 2006; 74: 365–381.

Strizzi L, Hardy KM, Seftor EA, Costa FF, Kirschmann DA, Seftor RE, et al. Development and cancer: at the crossroads of Nodal and Notch signaling. *Cancer Res.* 2009; 69: 7131–7134.

Sudol M. Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene* 1994; 9: 2145–2152.

Sun G, Irvine KD. Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. *Dev Biol* 2011; 350: 139–151.

Talbot LJ, Bhattacharya SD, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol* 2012; 3: 117-136.

Taylor GN, Sahestari L, Williams J, Mays WA, MacFarland S. Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Research* 1976; 36: 2740–2743.

Terpstra W, Ploemacher RE, Prins A, et al. Fluorouracil selectively spares acute myeloid leukemia cells with long-term growth abilities in immunodeficient mice and in culture. *Blood* 1996; 88: 1944-1950.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890.

Tobacman JK. Filament disassembly and loss of mammary myoepithelial cells after exposure to lambda-carrageenan. *Cancer Res* 1997; 57: 2823–2826.

Townsend TA, Wrana JL, Davis GE, Barnett JV. Transforming growth factor-beta-stimulated endocardial cell transformation is dependent on Par6c regulation of RhoA. *J Biol Chem* 2008; 283: 13834–13841.

Tsuji T, Ibaragi S, Hu GF. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res.* 2009; 69: 7135–7139.

Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K, Wei W, Dziechciarkova M, Ehrmann J, et al. Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer.* 2007; 7: 55.

Varelas X, Miller BW, Sopko R, Song S, Gregorieff A, Fellouse FA, Sakuma R, Pawson T, Hunziker W, McNeill H, et al. The Hippo pathway regulates Wnt/b-catenin signaling. *Dev Cell* 2010; 18: 579–591.

Vassilev A, Kaneko KJ, Shu H, Zhao Y, DePamphilis ML. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev* 2001; 15: 1229–1241.

Visvader JE. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* 2009; 23: 2563-2577.

Wada K, Itoga K, Okano T, Yonemura S, Sasaki H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* 2011; 138: 3907–3914.

Wang Y, Schulte BA, Larue AC, Ogawa M, Zhou D. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood* 2006; 107: 358-366.

Watson CJ, Khaled WT. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* 2008; 135: 995–1003.

Weijer K, Hart AA. Prognostic factors in feline mammary carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1983; 70: 709-716.

Yagi R, Chen LF, Shigesada K, Murakami Y, Ito Y. A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *Embo J* 1999; 18: 2551–2562.

Yu Fa-Xing e Guan Kun-Liang: The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes e Development* 2013; 27: 355–371.

Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, Zhao J, Yuan H, Tumaneng K, Li H, et al. Regulation of the Hippo–YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* 2012;150: 780–791.

Yu J, Zheng Y, Dong J, Klusza S, Deng WM, Pan D. Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev Cell* 2010; 18: 288–299.

Zappulli V, Caliarì D, Rasotto R, et al. Proposed Classification of the Feline "Complex" Mammary Tumors as Ductal and Intraductal Papillary Mammary Tumors. *Vet Pathol* 2013.

Zappulli V, De Cecco S, Trez D, Caliarì D, Aresu L, Castagnaro M. Immunohistochemical expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in feline mammary tumours. *J Comp Pathol* 2012; 147: 161-170.

Zhan L, Rosenberg A, Bergami KC, Yu M, Xuan Z, Jaffe AB, Allred C, Muthuswamy S.K. Dereglulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell* 2008; 135: 865–878.

Zhao B, Lei Qun-Ying L, Guan K: The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(6): 638–646.

Zhao B, Li L, Lu Q, Wang LH, Liu CY, Lei Q, Guan KL. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev* 2011; 25: 51–63.

Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(b-TRCP). *Genes Dev* 2010; 24: 72–85.

Zhao B, Li L, Wang L, Wang CY, Yu J, Guan KL. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev* 2012; 26: 54–68.

Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 2007; 21: 2747–2761.

Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, Lauwers GY, Thasler W, Lee JT, Avruch J, et al. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell* 2009; 16: 425–438.