

Imatinib mesilato nel trattamento di un mastocitoma cutaneo non operabile in un cane

Caon V e Valentini F

valentina_caon@hotmail.com

Introduzione

Delle neoplasie cutanee del cane il mastocitoma ne rappresenta circa il 7-25%. La terapia d'elezione è la chirurgia ad ampi margini associata o meno a chemioterapia adiuvante a seconda del grado e della localizzazione anatomica del tumore. Tuttavia, nei casi in cui la chirurgia non possa garantire dei margini esenti da tessuto patologico, si possono prendere in considerazione i chemioterapici a bersaglio molecolare. Tra questi, di crescente interesse è l'utilizzo di imatinib mesilato (Glivec®).

Caso clinico

Oliver, cane shar-pei maschio intero, 18 kg, di 9 anni, si presenta a visita ad agosto 2007 per una voluminosa massa cutanea che dalla palpebra inferiore si estende lungo tutta l'arcata zigomatica. I proprietari riferiscono che la lesione è presente da circa 3 mesi. Le condizioni cliniche generali di Oliver sono buone; unico sintomo, un forte prurito locale sulla lesione. Linfonodi regionali nella norma. Viene effettuato un prelievo citologico per ago-fissione sia dalla lesione che dai linfonodi regionali.

L'esame citologico rileva la presenza di numerose cellule rotondeggianti, con nucleo centrale e citoplasma contenente un numero variabile di granuli color porpora; presenti inoltre alcuni granulociti eosinofili. Il campione è compatibile con mastocitoma mediamente differenziato. I linfonodi regionali non risultano essere coinvolti. Iniziamo dunque a stadiare il tumore, effettuando esami ematochimici completi (emocromo con formula, biochimico esteso, coagulativo completo) elettroforesi, esame delle urine, radiografie del torace, ecografia dell'addome, prelievo di midollo osseo. Essendo una massa voluminosa ed adesa ai tessuti sottostanti, il soggetto è stato inserito in uno stadio III. Escludiamo di intervenire chirurgicamente ed optiamo per una terapia medica conservativa. Viene iniziata una terapia a base di clorfenamina maleato (Trimeton®) al dosaggio di 4 mg ogni 12h sottocute e lomustina (Prava®) a 90 mg/m² per os ogni tre settimane.

A distanza di circa un mese Oliver torna al controllo; è lievemente dimagrito, inappetente ed il tumore ha avuto una deludente remissione parziale. Prendiamo dunque in considerazione l'idea di impostare una terapia con imatinib mesilato (Glivec®), un nuovo farmaco a bersaglio molecolare che agisce selettivamente sulle cellule che esprimono l'antigene CD117 (KIT). Viene effettuata una

biopsia da sottoporre ad esame immunoistochimico per la ricerca dell'antigene KIT. La positività è superiore all'80%; imatinib viene prescritto alla dose di 5,5 mg/kg die x os. Il risultato è sorprendente: già dopo una settimana il tumore è regredito notevolmente. Alla terza settimana la remissione è del 70%. A questo punto viene proposto l'intervento chirurgico che avrebbe però comportato l'enucleazione dell'occhio e la creazione di un lembo per sopperire alla perdita di sostanza. I proprietari rifiutano l'eventualità chirurgica. Nel frattempo, causa ritardi nella reperibilità del farmaco, Oliver sospende la cura per una settimana e questa temporanea interruzione comporta una repentina ricrescita della massa. Nonostante la ripresa della terapia, il tumore non risponde più adeguatamente ed in breve tempo ritorna alle dimensioni originarie. A gennaio 2008 il cane viene sottoposto ad eutanasia.

Discussione

Imatinib è una piccola molecola a bersaglio molecolare capace di inibire l'attività della tirosin-chinasi associata al recettore di membrana c-KIT, presente nelle cellule del sistema ematopoietico del midollo, nelle cellule interstiziali del tratto digestivo e nei mastociti. Il suo utilizzo in veterinaria è innovativo e sembra promettente nel trattamento dei mastocitomi e dei tumori stromali gastrointestinali (GIST) che spesso risultano positivi a tale antigene. Inoltre, essendo un farmaco "a bersaglio" non comporta alcun tipo di effetto collaterale comune invece alla maggior parte dei chemioterapici tradizionali. Purtroppo, nonostante la "specificità", anche questo farmaco può subire fenomeni di farmaco-resistenza. Questa evenienza è ben documentata in medicina umana. Nel caso qui presentato è plausibile che l'interruzione della terapia abbia permesso lo sviluppo di cloni neoplastici resistenti responsabili della refrattarietà alla successiva somministrazione di imatinib. Altro limite è il costo estremamente elevato del farmaco.

Nuovi aspetti della terapia a bersaglio molecolare: mastocitoma CD117 negativo responsivo ad imatinib

*Verganti S. Bettini G., Crispino GP., Ciaramella L., Finotello R., Turba M.E., Marconato L.
sara.verganti@yahoo.it*

Introduzione

Il mastocitoma è il tumore cutaneo più comune nel cane (16-21%), con comportamento biologico estremamente variabile: in alcuni casi la sola exeresi chirurgica risulta curativa, in altri è necessario un approccio multimodale^{1,2}. La scoperta del coinvolgimento del proto-oncogene *c-kit* nella sua patogenesi^{3,6,7} ha permesso di sviluppare nuove strategie terapeutiche per il trattamento di questa neoplasia^{4,5}. Dai dati pubblicati si evince che il 15-50% dei mastocitomi presenta mutazioni del gene *c-kit*, soprattutto a livello di esone 11^{3,5-7}, che determinano l'auto-attivazione costitutiva del recettore KIT; tali mutazioni sono inoltre associate a grado istologico elevato, localizzazione citoplasmatica aberrante di KIT e prognosi peggiore^{3,5,8}. Lo sviluppo di inibitori tirosin-chinasici ed i recenti studi pubblicati in medicina veterinaria hanno evidenziato come l'imatinib rappresenti un'efficace opzione terapeutica nel trattamento dei mastocitomi canini KIT-positivi (CD117+), specialmente in quei casi in cui le terapie convenzionali non siano più efficaci o attuabili³⁻⁹.

Caso clinico

Nel febbraio 2008 un cane Breton femmina di 5 anni era riferito in seguito ad exeresi chirurgica a margini indenni di una prima recidiva di mastocitoma di terzo grado in sede perineale per iniziare chemioterapia adiuvante. Alla visita clinica del paziente, che si presentava in buone condizioni generali, si evidenziava solo splenomegalia; all'EOP la ferita chirurgica era cicatrizzata ma la cute circostante appariva calda ed eritematosa. Si procedeva quindi alla stadiazione del soggetto comprensiva di esame emocromocitometrico, profilo biochimico e coagulativo, esame delle urine, ecografia dell'addome, Rx del torace, esame citologico di fegato, milza e midollo osseo, che risultava negativa per la ricerca di metastasi. L'esame del midollo osseo evidenziava iperplasia della filiera eosinofila associata ad ipereosinofilia periferica. Si proponeva quindi un trattamento chemioterapico adiuvante con vinblastina @ 2 mg/m² EV (ogni 7 giorni per 8 cicli) e prednisone 40 mg/m² PO (ogni 24 ore), da effettuare nella clinica referente. Dopo 2 mesi dal termine del trattamento (6 cicli) l'animale era portato in visita per la comparsa di una nuova neoformazione in sede perineale, in corrispondenza della cicatrice, con la concomitante emissione di feci assottigliate. Il soggetto si presentava in buone condizioni generali ma all'EOP si apprezzava una massa eritematosa, alopecica, sessile, di consistenza duro-elastica, in corrispondenza del moncone della coda, con deviazione e compressione dello sfintere anale. L'esame citologico della neoformazione confermava la diagnosi di mastocitoma indifferenziato. Si optava ai fini di stadiazione e per verificare eventuale resecabilità del mastocitoma per una TC della regione perineale che

evidenziava il coinvolgimento per contiguità della parete rettale e linfadenomegalia dei linfonodi iliaci. L'esame citologico TC guidato confermava la presenza di metastasi linfonodali: il tumore era giudicato inoperabile. Quindi si consigliava un protocollo chemioterapico con lomustina@90 mg/m² PO (ogni 28 giorni) e prednisone@40 mg/m² PO (ogni 24 ore) mentre si eseguiva ricerca della positività a KIT con metodica immunocitochimica e delle mutazioni di *c-kit* mediante analisi di frammento su sequenziatore automatico. Nonostante il mastocitoma risultasse CD117 negativo (lieve positività limitata alla membrana citoplasmatica), i proprietari decidevano di iniziare comunque la terapia con imatinib@4,4 mg/kg PO. Dopo 12 giorni di trattamento, il paziente veniva ricoverato in un'altra struttura con sintomi ascrivibili a degranulazione massiva del mastocitoma (tachicardia, tachipnea, ematuria, melena); trattato con terapia sintomatica, le sue condizioni miglioravano in 48 ore. Nel contempo, l'analisi genetica rivelava la presenza di una mutazione in corrispondenza dell'esone 11 del gene *c-kit* rappresentata da una duplicazione di 48 bp. Portato per un controllo, il soggetto appariva in buone condizioni generali, la massa perineale era scomparsa e l'ecografia dell'addome confermava la remissione completa del mastocitoma. Tuttavia, valutando le mucose (subitteriche) e gli esami di laboratorio (esame emocromocitometrico, profilo biochimico), si emetteva diagnosi di anemia emolitica, per cui si instaurava una terapia adeguata e si sospendeva la somministrazione di lomustina. Il trattamento con imatinib era invece continuato. L'animale è in vita a distanza di 60 giorni dalla visita della seconda recidiva e da 39 giorni è in remissione completa.

Discussione

L'utilizzo di imatinib per il trattamento del mastocitoma canino è ormai di indiscusso valore, soprattutto in caso di neoplasie refrattarie ai tradizionali chemioterapici o in cui le terapie convenzionali non possono essere utilizzate^{4,5,9}. In medicina veterinaria si è osservato che la maggior parte delle mutazioni di *c-kit* nei mastocitomi del cane è localizzata a livello di esone 11 ed è ascrivibile a ITD (internal tandem duplication); spesso tali mutazioni determinano localizzazione citoplasmatica aberrante di KIT^{3,5-8}. Nel nostro caso il mastocitoma è risultato essere CD117 negativo (presente solo una debole positività di membrana) e la mutazione una duplicazione di 48 pb sull'esone 11. Deve essere tuttavia sottolineato che la valutazione del pattern di espressione cellulare di KIT su campioni citologici piuttosto che istologici, ancorché di estrema praticità, si presta maggiormente ad artefatti e dubbi interpretativi. Inoltre, come dimostrato da questo caso, la mancata localizzazione aberrante di KIT non esclude completamente la presenza di mutazioni a carico di *c-kit*, con conseguente attivazione del recettore. Il trattamento con imatinib è risultato infatti efficace determinando la remissione completa della neoplasia.

Nei pochi studi pubblicati inerenti l'utilizzo dell'inibitore tirosin-chinasico nel cane non è riportato alcun effetto collaterale conseguente alla sua somministrazione^{5,9}. In questo caso, vista la concomitante assunzione di corticosteroidi, è difficile stabilire se l'anemia emolitica sia dipesa dall'assunzione dell'inibitore tirosin-chinasico o se invece sia ascrivibile a forma primitiva.

1. Thamm DH, Vail DM. Mast cell tumors. In: Withrow SJ, Vail DM, eds. Withrow & MacEwen's. Small Animal Clinical Oncology, 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Co; 2007:402-424.
2. Marconato L, Albanese F. Tumori di cute e sottocute. In: Marconato L; Del Piero F, eds. Poletto. Oncologia medica dei piccoli animali, 1° ed. 2005:208-226.
3. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, et al. The role of *c-kit* in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. Neoplasia 2006; 8-2:104-111.
4. London C. Kinase inhibitors in cancer therapy. Vet Comp Oncol 2004; 2,4:177-193.
5. Marconato L, Bettini G, Giacoboni C, et al. Clinicopathological features and outcomes for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. J Vet Intern Med 2008; 22:1001-1007.
6. London CA, Galli SJ, Yuuki T, et al. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene *c-kit*. Exp Hematol 1999; 27:689-697.
7. Downing S, Chien MB, Kass PH, et al. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of *c-kit* in mast cell tumors of dogs. Am J Vet Res 2002; 63:1718-1723.
8. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, et al. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with *c-kit* and its role in prognostication. Vet Pathol 2007; 44:298-308.
9. Isotani M, Ishida N, Tominaga K, et al. Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. J Vet Intern Med 2008; 22:985-988.

Ruolo prognostico della citologia ecoguidata di milza e fegato nella stadiazione del mastocitoma cutaneo canino: 52 casi (2001-2006)

Valenti P, Stefanello D, Faverzani S, Bronzo V, Fiorbianco V, Pinto da Cunha N, Romussi S e

Cantatore M

paola.valenti@fastwebnet.it

Introduzione

Il mastocitoma cutaneo canino, in virtù del suo comportamento biologico estremamente variabile, necessita di un'accurata stadiazione al fine di identificare la presenza di metastasi a distanza necessaria per definirne la prognosi corretta. La sola identificazione di mastociti nei campioni, come suggerita dalla WHO, appare un metodo sempre più inappropriato per decretare la presenza di metastasi agli organi bersaglio. Il presente lavoro si prefigge di valutare in senso retrospettivo il ruolo prognostico della citologia ecoguidata di fegato e milza basandosi su criteri quali-quantitativi nella stadiazione del mastocitoma canino e di confrontare i tempi di sopravvivenza tra cani con e senza metastasi a distanza.

Materiali e metodi

52 cani con diagnosi di mastocitoma cutaneo (MC). Criterio di inclusione assoluto è stato la valutazione citologica di fegato e milza al fine di identificare la presenza di metastasi a distanza. I campioni citologici sono stati considerati positivi per metastasi in presenza di: a) mastociti ben differenziati organizzati in clusters; b) mastociti ben differenziati in largo numero; c) mastociti con morfologia atipica. I campioni sono stati invece considerati negativi se il campione: a) non conteneva mastociti; b) conteneva mastociti ben granulati, rari e sparsi; c) conteneva mastociti ben differenziati prevalentemente associati a connettivo. Sono stati inoltre riportati i quadri ecografici di milza e fegato per i cani con e senza metastasi. I tempi di sopravvivenza sono stati stimati mediante le curve di Kaplan Meier e le differenze tra le curve sono state analizzate mediante il Log Rank test ($P < 0,001$)

Risultati

10 cani su 52 (19,2%) con MC presentavano metastasi a distanza a fegato e milza e 4 di questi casi presentavano concomitante coinvolgimento dei linfonodi regionali. Otto pazienti erano già stati sottoposti ad exeresi chirurgica e sei di questi (60% dei pazienti metastatici) presentavano recidiva locale al momento della diagnosi di metastasi a distanza. Dal punto di vista istopatologico nove dei casi metastatici era rappresentata da mastocitomi di II grado (90%) e da un mastocitoma di III grado. Dal punto di vista ecografico la maggior parte dei casi (70%) con metastasi viscerali

presentavano due o più alterazioni ecografiche contemporaneamente a fegato e milza (organomegalia, lesioni focali, disomogeneità del parenchima le alterazioni più comuni). L'assenza di alterazione ecografiche è stata invece riscontrata in 21 casi (50%) del gruppo non metastatici. In 18 casi su 42 (42,9%) del gruppo non metastatici sono stati comunque identificati mastociti nel campione. I cani con metastasi a distanza presentavano un tempo di sopravvivenza statisticamente più breve (34 giorni) di quanto riportato nei cani senza metastasi (780 giorni) ($P=0,0001$).

Discussione

I cani con evidenza citologica di metastasi a fegato e milza hanno presentato un tempo di sopravvivenza significativamente minore rispetto a cani senza metastasi a distanza e la valutazione citologica di tipo quali-quantitativo è risultata utile ai fini prognostici. Nonostante questo studio presenti numerose limitazioni dovute alla natura retrospettiva dello stesso, il metodo applicato può essere considerato un punto di partenza per futuri studi prospettici che possano associare l'utilizzo della citologia tradizionale a tecniche più sofisticate quali immunocitochimica, immunoistochimica e valutazioni di mutazioni del C-kit nella ricerca di metastasi in corso di mastocitoma.

Inoltre, sulla base dei risultati di questo studio, la citologia di fegato e milza è da considerarsi strumento di stadiazione indispensabile in pazienti con anomalie ecografiche a fegato e milza soprattutto in cani considerati a maggior rischio metastatico (II e III grado, coinvolgimento linfonodale).

Espressione del recettore KIT (CD117) nel mastocitoma del cane: confronto citologia-istologia in 26 casi

Cesari A, Bettini G, Scarpa F, Morini M, Marconato L, Capitani O.e Zini E

alessandro.cesari2@unibo.it

Introduzione

Il recettore CD117 (KIT o Stem Cell Factor Receptor) è una proteina transmembrana ad attività tirosin-chinasica normalmente presente nelle cellule germinali, nelle cellule mieloidi immature e nei mastociti. Nei mastociti è possibile verificare con l'immunoistochimica l'esclusiva localizzazione di CD117 a livello di membrana citoplasmatica. Nel mastocitoma del cane l'espressione di CD117 è mantenuta, ma spesso delocalizzata, con comparsa di positività a livello citoplasmatico. In particolare, l'immunopositività viene graduata come KIT-pattern 1 se la positività è esclusivamente limitata alla membrana citoplasmatica, KIT-pattern 2 se la proteina KIT è presente anche a livello citoplasmatico sotto forma di aggregati multipli puntiformi o singoli a livello paranucleare, KIT-pattern 3 in caso di positività citoplasmatica intensa e diffusa.

Diversi studi hanno correlato la localizzazione di tale espressione al grado istologico e al comportamento biologico del mastocitoma, evidenziando la frequente associazione fra internalizzazione del recettore, minor differenziazione e comportamento più aggressivo. Inoltre, la localizzazione citoplasmatica del segnale immunoistochimico può indicare mutazioni attivanti del proto-oncogene c-kit, a suggerire una potenziale efficacia del trattamento con farmaci antitirosinchinasici.

Materiali e metodi

Poiché la diagnosi di mastocitoma nel cane e nel gatto è generalmente raggiunta con ottima specificità tramite la citologia agoaspirativa, si è voluto verificare se l'applicazione di metodiche immunocitochimiche per il CD117 a preparati citologici normalmente allestiti poteva fornire le stesse indicazioni dell'immunoistochimica, quanto ad intensità e localizzazione della positività.

Risultati e discussione

Nei 26 casi testati è stato possibile verificare attraverso il test k una buona concordanza fra i risultati delle due tecniche, soprattutto se i KIT-pattern 2 e 3 vengono considerati insieme, evidenziando quindi che la valutazione dell'espressione del recettore KIT su preparati citologici fornisce nella maggior parte dei casi risultati simili a quelli ottenuti su preparati istologici, ma in tempi più rapidi e utilizzando campioni prelevabili con maggiore semplicità. È stato inoltre verificato che gli strisci post-fissati in acetone mantengono una soddisfacente immunoreattività per circa 10 settimane,

mentre non è stato possibile recuperare la reattività nei preparati precedentemente colorati con May Grünwald – Giemsa.

Valutazione comparativa di attività proliferativa, differenziazione ed espressione immunoistochimica di CD117 nelle metastasi linfonodali rispetto al tumore primitivo nel mastocitoma del cane

Scarpa F, Cesari A, Morini M, Marconato L, Capitani O e Bettini G

filippo.scarpa2@unibo.it

Introduzione

Il mastocitoma (MCT) è una delle neoplasie cutanee più comuni del cane, in cui rappresenta il 7-21% di tutte le neoplasie cutanee. Il comportamento biologico del mastocitoma è molto variabile; mentre alcuni sono tendenzialmente benigni e trattabili con successo con la sola chirurgia, altri mostrano crescita rapida e tendenza a dare metastasi. Per definire la prognosi della malattia è stato proposto lo studio di numerosi fattori. Fra quelli di pertinenza istopatologica quelli risultati più attendibili sono il grado istologico, alcuni marker di proliferazione cellulare (Ki67, AgNOR), la vascolarizzazione intratumorale, e il tipo di espressione immunoistochimica del recettore tirosin-chinasico CD117 (KIT pattern).

Le popolazioni neoplastiche sono spesso un insieme di cloni cellulari dotati di caratteristiche biologiche diverse, nel cui contesto avvengono continui fenomeni evolutivi che generalmente portano alla selezione del clone con maggiore attività replicativa e dotato di maggiori capacità invasive. Sebbene si tenda ad assumere l'uguaglianza fra tumore primitivo e metastasi, la popolazione cellulare che colonizza siti distanti è il risultato di tale selezione, e pertanto dovrebbe essere portatrice di maggiori caratteri di malignità.

Materiali e metodi

Allo scopo di valutare un'eventuale espressione differenziale di fattori prognostici istopatologici fra tumore primitivo e metastasi linfonodali, è stata selezionata una casistica di mastocitomi di cane in cui al momento dell'asportazione chirurgica del tumore fosse stato rimosso anche il linfonodo tributario, e che questo fosse risultato positivo all'esame istologico.

Sui casi selezionati sono state eseguite le seguenti determinazioni, sia sul tumore primitivo che sulla metastasi linfonodale: grado di differenziazione (in sezioni colorate con ematossilina e blu di toluidina); espressione dei marker di proliferazione cellulare AgNOR (tramite procedura istochimica di colorazione argentea e analisi quantitativa della reazione) e Ki67 (tramite colorazione immunoistochimica con anticorpo MIB-1 e quantificazione della quota cellulare proliferante); valutazione dell'espressione del recettore KIT (colorazione immunoistochimica per CD117 e valutazione qualitativa della localizzazione della positività).

Risultati

Sono stati complessivamente valutati 14 casi di mastocitoma cutaneo di cane in cui l'esame istologico ha confermato la presenza di metastasi linfonodali. Il grado istologico del tumore primitivo era 2 in 10 casi e 3 nei restanti 4 casi; in 9 casi la metastasi linfonodale era di tipo nodulare e in 5 casi rappresentata da sparsi aggregati di 5-10 mastociti. I casi in cui nelle sezioni istologiche di linfonodo erano presenti sporadici mastociti sotto forma di elementi isolati sono stati esclusi dallo studio.

Il confronto dei parametri considerati ha evidenziato in 4 casi una minore differenziazione dei mastociti metastatici rispetto a quelli presenti nel tumore primitivo. I parametri di attività proliferativa (AgNOR, Ki67) hanno evidenziato una significativa maggiore attività cinetica nelle metastasi rispetto al tumore primitivo. La valutazione immunoistochimica di CD117 ha evidenziato in tutti i casi la sovraespressione del recettore (tumori primitivi: KIT-pattern 2 in 9 casi, KIT-pattern 3 in 5 casi), con la tendenza dell'immunoreattività a mantenersi costante fra tumore primitivo e metastasi. In 4 casi nei mastociti metastatici la sovraespressione di KIT era quantitativamente inferiore.

Discussione

Lo studio ha messo in evidenza differenze qualitative e quantitative nell'espressione di marker prognostici fra tumore primitivo e metastasi linfonodali. Al di là delle considerazioni di biologia dei tumori che possono essere responsabili di tali differenze, nella valutazione complessiva dei singoli casi deve essere tenuto in considerazione che i parametri istopatologici di prognosi possono manifestare differenze anche sensibili secondo la sede da cui è stato prelevato il campione.

Set up dell'analisi di genescanning per l'identificazione delle mutazioni somatiche del mastocitoma canino

Turba ME, Bettini G, Calzolari C, Marconato L, Cesari A, Morini M e Gentilini F

claudia.calzolari@libero.it

Introduzione

L'identificazione a livello molecolare di mutazioni del proto-oncogene *c-KIT* nel mastocitoma canino può avere importanti ricadute in termini prognostici e/o fornire importanti indicazioni sul tipo di risposta alla terapia. Mutazioni *c-KIT* sono presenti in proporzione variabile a seconda degli studi tra l'8% e il 35% dei mastocitomi canini ma fino al 50% dei mastocitomi di grado 2 e 3¹⁻³.

L'indicazione più importante che può fornire l'analisi genetica è legata all'evidenza che tali mutazioni comportano l'attivazione costitutiva di *c-KIT* e quindi una dis-regolata attività tirosin-chinasica che rappresenta il bersaglio molecolare di farmaci come Gleevec®⁴.

La presenza di mutazioni è correlata significativamente a valori sfavorevoli di predittori come Ki67 e AgNOR, così come la presenza di mutazioni è correlata significativamente alla presenza di patterns di localizzazione aberrante citoplasmatica del recettore KIT⁵.

Con queste premesse, gli autori hanno ritenuto che un test molecolare rapido ed accurato potesse risultare estremamente utile nella clinica oncologica veterinaria.

Materiali e metodi

E' stata disegnata una coppia di primer che consentisse di amplificare mediante PCR la regione di DNA corrispondente all'esone 11 ed alla porzione 5' dell'introne 11 di *c-KIT* comprendente sia le regioni delle mutazioni *internal tandem duplications* (ITDs) sia piccole delezioni di 3-6 bp^{3,4,6}.

Il primer forward è stato marcato in posizione 5' con fluoroforo 6-FAM. Sono stati inclusi nella messa a punto del test genetico 5 casi di mastocitomi canini spontanei ed 1 tessuto canino normale come controllo negativo. In 1 caso il DNA è stato estratto sia da sezioni di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina sia dal corrispondente tessuto congelato a -80°C, in altri casi il DNA è stato estratto dal vetrino fissato e colorato con May Grunwald-Gimsa sia dal materiale strisciato e non colorato. Il DNA è stato poi amplificato mediante PCR su termociclatore Eppendorf EP Gradient S. Successivamente 1 µl del prodotto di PCR opportunamente diluito a concentrazioni variabili tra 1:20 e 1:40 è stato aggiunto a 20 µl di formamide e 0.1 µl di size standard. Il campione è stato poi analizzato in doppio con sequenziatore automatico ABI Prism 310 (Applied Biosystem) fornito di capillare di 47 cm di lunghezza caricato con Performance Optimized Polimer-4 alle

condizione di iniezione di 15 KV per 5 secondi; il risultato analizzato con software dedicato GeneMapper HID v.3.2.

Risultati

La PCR ha consentito di amplificare un prodotto di peso atteso di 201 bp corrispondente all'allele wild type sia nel controllo negativo sia in tutti i tessuti di mastocitoma. In due casi l'analisi ha evidenziato un secondo picco di peso 240 bp e 249 bp. Tali risultati hanno chiaramente permesso di individuare nei due casi una mutazione ITD. I risultati prodotti dall'analisi della sezione istologica sono risultati del tutto identici a quello ottenuto dal corrispondente campione congelato.

Discussione

Gran parte della bibliografia disponibile riporta l'analisi delle mutazioni del gene *c-KIT* mediante visualizzazione su gel di agarosio al 2%. Tale tecnica di visualizzazione ha scarso potere di risoluzione e non consente di individuare delezioni o inserzioni di poche basi. L'analisi mediante analisi di frammento su sequenziatore automatico (GeneScanning) presenta numerosi vantaggi rispetto alla tecnica tradizionale: in primo luogo consente di discriminare prodotti di PCR che differiscono anche di 1 solo nucleotide; in secondo luogo è estremamente accurata e riproducibile e consente di misurare con precisione la dimensione dell'inserzione o delezione.

10. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, et al. The role of c-kit in tumorigenesis: Evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 2006; 8:104-111.
11. Downing S, Chien MB, Kass PH, et al. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res* 2002; 63:1718-1723.
12. Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Mutations in the Juxtamembrane Domain of c-KIT Are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs. *Vet. Pathol.* 2002; 39: 529-535.
13. Ma Y, Longley BJ, Wang X, et al. Clustering of activating mutations in *c-KIT*'s juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J. Invest Dermatol*; 1999, 112: 165-170.
14. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, et al. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with c-kit and its role in prognostication. *Vet Pathol* 2007; 44:298-308.
15. London CA, Galli SJ, Yuuki T, et al. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp Hematol* 1999; 27: 689-697