



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PERUGIA



**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Fisiopatologia e medicina degli animali d'affezione**

**XVII CICLO**

Settore Scientifico Disciplinare VET03

***Analisi dell'espressione genica di MMP-2 e MMP-9 in rapporto ai loro inibitori  
tissutali, TIMP-2 e TIMP-1 nel meningioma di cane***

***Gene Expression of MMP-2 and MMP-9 and correlated ratio with specific  
inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in canine meningioma***

CANDIDATO

Dott.ssa Alice Reginato

RELATORE

Prof.ssa Maria Teresa Mandara

COORDINATORE: Prof. Luca Mechelli

A. A. 2013/2014

*A Mamma e Papà*

## Indice

1. <b>Abstract</b> .....	5
2. <b>Riassunto</b> .....	7
3. <b>Introduzione</b> .....	9
4. <b>Il meningioma del cane: caratteri clinico-patologici generali</b> .....	13
4.1. Origine del meningioma .....	13
4.2. Incidenza, localizzazione ed aspetti macroscopici .....	14
4.3. Segnalamento e segni neurologici .....	18
4.4. Indagini di laboratorio .....	21
4.5. Aspetti radiografici .....	23
4.6. Classificazione istologica del meningioma in oncologia umana e veterinaria .....	27
5. <b>Vecchi presupposti e nuove frontiere per la comprensione del comportamento biologico del meningioma</b> .....	33
5.1. Meningioma ed ormono-dipendenza .....	35
5.2. Meningioma ed attività telomerasica .....	38
5.3. Meningioma e molecole di adesione.....	41
5.4. Meningioma, edema perilesionale e VEGF .....	47
5.5. Anomalie cromosomiche e profili di espressione genica .....	54
6. <b>Le metalloproteinasi di matrice (MMPs) loro inibitori tissutali (TIMPs): regolatori del microambiente tumorale e della progressione neoplastica</b>	62
6.1. La matrice extracellulare e il microambiente tumorale .....	63

6.2. Struttura e attività biologica di MMPs e TIMPs .....	65
6.3. Ruolo di MMPs e TIMPs nella progressione neoplastica .....	76
6.4. MMPs, TIMPs e meningioma .....	83
<b>7. Parte sperimentale .....</b>	<b>91</b>
7.1. Materiali e metodi .....	91
7.1.1. Selezione dei casi oggetto di studio .....	91
7.1.2. Indagini istopatologiche .....	92
7.1.3. Estrazione dell'acido nucleico (RNA) .....	94
7.1.4. Valutazione quantitativa e qualitativa dell'estratto mediante spettrofotometro .....	97
7.1.5. Retrotrascrizione dell'estratto .....	98
7.1.6. Progettazione dei primer .....	99
7.1.7. Progettazione delle sonde .....	103
7.1.8. Real Time RT-PCR .....	108
7.1.9. Analisi statistica .....	110
7.2. <b>Risultati</b> .....	<b>111</b>
7.3. <b>Discussioni e conclusioni finali</b> .....	<b>120</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>131</b>

## 1. Abstract

In the recent years, in both human and veterinary oncology there has been a considerable interest in studying metalloproteinase activity of neoplastic cells as a possible independent prognostic marker and target for therapeutic options. Degradation of extracellular matrix is associated with tumor invasion and metastasis, and matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are the key mediators of this process. In this study the expression of MMP-9 and MMP-2, known as type IV collagenases, and of their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 has been investigated in canine meningioma. Fifty-four cases of both intracranial and spinal tumors were selected from the archive of Neuropathology Laboratory of our Department. RNA was obtained from formalin-fixed and paraffin embedded tissue, converted to cDNA and submitted to quantitative polymerase chain reaction. Statistical analysis was performed to assess the variation of the expression of these molecules and their relative ratio among the three histological grades of meningioma. MMP-9 expression was undetectable in all the investigated meningiomas. On the contrary all the tumors expressed MMP-2 though without any significant differences in the three histological grades; in the same way also the MMP-2/TIMP-2 ratio didn't differ in benign, atypical and anaplastic meningiomas. Significantly higher ( $p < 0.001$ ) was the expression of MMP-2 in the papillary meningiomas. These tumors showed a MMP-2/TIMP-2 ratio strongly skewed in favor of metalloproteinase, suggesting that this imbalance may be one of the molecular basis of the aggressive biological behavior that seems to characterize

this histologic subtype also in dogs. TIMP-1 expression increased significantly from grade I to grade II ( $p < 0.001$ ) and in papillary meningiomas ( $p < 0.5$ ), but it decreased in grade III tumors with no significant difference between benign and anaplastic meningiomas.

In this study the first step of MMPs and TIMPs synthesis, revealed by mRNA transcription, has been investigated; further studies are needed to investigate the successive stages related to the genetic expression, to finally clarify the role of gelatinases and their inhibitors in neoplastic progression of canine meningioma. In this study the identification of peculiar molecular expression in the papillary meningioma supports that canine meningioma should be considered as a morphologically as well as biologically heterogeneous group of neoplasms.

## **2. Riassunto**

Negli ultimi anni, lo studio dell'attività metalloproteinasi delle cellule neoplastiche ha suscitato grande interesse sia in oncologia umana che veterinaria, quale possibile marker prognostico e target per nuove frontiere terapeutiche. La degradazione enzimatica della matrice extracellulare è un evento essenziale nel processo di infiltrazione e di metastatizzazione delle cellule neoplastiche nel quale un ruolo chiave è svolto dalle metalloproteinasi di matrice (MMPs) e dai loro inibitori tissutali (TIMPs). In questo studio è stata indagata l'espressione delle gelatinasi MMP-9 e MMP-2 e dei loro rispettivi inibitori tissutali, TIMP-1 e TIMP-2, nel meningioma di cane. Cinquantaquattro meningiomi di cane intracranici e spinali sono stati selezionati dagli archivi del Laboratorio di Neuropatologia del nostro dipartimento. Dal tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina è stato estratto l'RNA, che è stato successivamente retrotrascritto a cDNA e sottoposto ad indagine di PCR. Successivamente, sono state compiute indagini statistiche al fine di valutare l'andamento dell'espressione di tali molecole ed, in particolare, del rapporto tra MMP e relativo inibitore, nei tre gradi istologici della neoplasia. Nessuno dei meningiomi indagati ha espresso la MMP-9. Al contrario in tutti i tumori dello studio è stata riscontrata l'espressione di MMP-2, sebbene senza alcuna differenza statisticamente significativa nei tre gradi istologici; allo stesso modo, anche il rapporto MMP-2/TIMP-2 non ha mostrato variazioni nei meningiomi benigni, atipici e anaplastici. MMP-2 è risultata invece molto più espressa ( $p < 0.001$ ) in un particolare sottotipo istologico del tumore meningiale, il

meningioma papillare. I meningiomi papillari indagati in questo studio hanno mostrato un rapporto MMP-2/TIMP-2 fortemente sbilanciato a favore dell'attività proteasica, lasciando supporre che tale squilibrio possa essere una delle basi molecolari che giustificano il comportamento biologico aggressivo di questo tipo di neoplasia, ampiamente dimostrato nell'uomo e recentemente ipotizzato anche nel cane. L'espressione di TIMP-1 è risultata significativamente crescente dal grado I al II ( $p < 0.001$ ) e nei meningiomi papillari ( $p < 0.5$ ), per poi diminuire nelle neoplasie di grado III, tanto che tra meningiomi benigni ed anaplastici non è stata osservata alcuna differenza.

In questo progetto è stato indagato il primo passaggio nella sintesi delle gelatinasi e dei relativi inibitori, rappresentato dalla trascrizione del mRNA. Ulteriori studi sono necessari per indagare le fasi successive legate all'espressione genica delle proteine, per chiarire definitivamente il ruolo che queste molecole svolgono nella progressione neoplastica del meningioma di cane.

Tra i risultati ottenuti in questo studio, l'identificazione di peculiari caratteristiche molecolari nel meningioma papillare supporta la necessità di considerare il meningioma di cane come un gruppo morfologicamente e biologicamente eterogeneo di neoplasie.

### 3. Introduzione

Il meningioma è la neoplasia del Sistema Nervoso Centrale (SNC) a più elevata incidenza nel cane (Snyder et al., 2006). Una delle caratteristiche distintive di questo tumore è la sua ampia variabilità morfologica e fenotipica (Motta et al., 2012), derivante dalla duplice natura mesenchimale e neuroepiteliale dell'aracnoide, meninge da cui esso prende origine (Summers et al., 1994). Nonostante tale eterogeneità fenotipica, il meningioma è tradizionalmente considerato un tumore dal comportamento benigno, dai caratteristici aspetti istopatologici e di risonanza magnetica (Buetow et al., 1991), nell'uomo (Louis et al., 2007) come nel cane (Motta et al., 2012). Nella sua crescita lenta ed espansiva, tale neoplasia produce numerosi effetti secondari sul tessuto nervoso prossimo alla lesione o sulla dinamica del liquido cefalorachidiano, responsabili dei segni clinici che il paziente manifesta (Gallagher et al., 1993; Gordon et al., 1994; Axlund et al., 2002; Bagley, 2004). Nell'uomo l'asportazione chirurgica rappresenta la terapia d'elezione, tale che un'eventuale recidiva viene generalmente imputata all'incompleta resezione (von Radow et al., 2006). Tuttavia, alcune neoplasie si ripresentano anche a seguito di una resezione chirurgica completa (Maier et al., 1992; Palma et al., 1997; Schiffer et al., 2005). Per spiegare questa evidente eterogeneità nell'evoluzione clinica dei pazienti, in medicina umana è stato formulato un sistema di gradazione che tiene conto della correlazione tra parametri morfologici istopatologici e dati di *follow up*, al fine di identificare aspetti morfologicamente rilevabili di attendibile valore prognostico. Tale sistema individua nell'uomo tre gradi istopatologici, predittivi

del comportamento biologico (Louis et al., 2007). Nel cane l'attuale classificazione dei tumori del SNC (Koestner et al., 1999) non prevede per il meningioma un sistema di gradazione, sebbene recentemente siano stati compiuti degli incoraggianti tentativi di applicazione del sistema classificativo umano al cane (Sturges et al., 2008; Mandara et al., 2010).

L'identificazione di specifici parametri morfologici spesso giustifica solo in parte il comportamento biologico del meningioma. Per meglio comprendere tale comportamento, da anni ricercatori di tutto il mondo indagano l'espressione di marker biologici sul tessuto neoplastico, siano essi riferibili agli effetti primari (indice mitotico, recettori ormonali, progressione maligna) o agli effetti secondari del tumore (neovascolarizzazione, infiltrazione, edema peritumorale) (Kalkanis et al., 1996; Goldman et al., 1997; Provias et al., 1997; Paek et al., 2002; Platt et al., 2006; Dickinson et al., 2008).

Un punto critico nella progressione tumorale del meningioma è l'infiltrazione dei tessuti circostanti, evento che generalmente si rende responsabile della recidiva post-operatoria della neoplasia, e che si rinviene più frequentemente nei tumori di grado elevato (von Radow et al., 2006). L'infiltrazione dei tessuti peritumorali da parte delle cellule neoplastiche viene considerata un processo multifasico che prevede diverse tappe consequenziali; una di queste, probabilmente la più decisiva, è la degradazione della matrice extracellulare che circonda le cellule neoplastiche, evento essenziale per la loro mobilitazione oltre che per il raggiungimento dei vasi sanguigni, vie di accesso all'intero organismo (von Radow et al., 2006). Rientra in questo meccanismo il ruolo delle

metalloproteinasi di matrice (MMPs), endopeptidasi ad azione proteolitica selettiva in grado di degradare specifiche componenti della matrice extracellulare (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). La potenzialità di tali molecole ha suscitato notevole interesse nel campo della ricerca oncologica. Nell'ultimo decennio le MMPs sono state oggetto di numerosi studi che ne hanno dimostrato il ruolo non trascurabile giocato nella progressione neoplastica (Roy et al., 2009; Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). L'attività di tali molecole è contrastata da specifici inibitori endogeni, gli inibitori tissutali delle metalloproteinasi di matrice (TIMPs), i quali, opponendosi alla degradazione della matrice extracellulare, finiscono per ricoprire anch'essi un ruolo determinante nella progressione neoplastica. In particolare, è stato ipotizzato che alla base della evoluzione di una neoplasia primaria da una forma ben localizzata a una forma invasiva e metastatica, vi sia un rapporto tra MMPs/TIMPs sbilanciato a favore dell'attività proteasica (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). L'attività delle MMPs e dei relativi inibitori è stata indagata in numerosi tumori, compreso il meningioma di uomo (Okada et al., 2004; von Radow et al., 2006; Moon et al., 2010; Barresi et al., 2011; Iwado et al., 2012; Pei et al., 2012;) e di cane (Mandara et al., 2009; Beltran et al., 2013), generalmente mediante analisi squisitamente fenotipiche e con risultati non sempre univoci. Al contrario, scarsa attenzione è stata riservata allo studio del rapporto MMPs/TIMPs.

Dal canto suo, nei confronti dell'infiltrazione del parenchima cerebrale da parte delle cellule neoplastiche meningiali, le opzioni terapeutiche possibili prevedono

il ricorso a radioterapia e chemioterapia (Marosi et al., 2003). Tuttavia, non sempre i meningiomi sono sensibili al trattamento radioterapico e l'efficacia della chemioterapia è controversa per il frequente riscontro di farmacoresistenza nelle cellule meningiali neoplastiche (Tews et al., 2001; Andersson et al., 2004). In questo contesto, il riconoscimento di un effettivo ruolo delle MMPs, TIMPs e del loro rapporto relativo, potrebbe aprire la strada a nuove ed efficaci strategie terapeutiche.

Partendo da queste premesse, scopo di questa ricerca è quello di indagare i livelli di espressione genica di MMP-9 e MMP-2 e dei relativi inibitori nel meningioma di cane, valutando come essi si modificano nei tre gradi istologici del tumore. Inoltre, particolare attenzione è stata posta allo studio del rapporto tra MMPs e TIMPs, con lo scopo di identificare un possibile squilibrio associabile alla progressione di questa malattia neoplastica. Attraverso la valutazione dei livelli di mRNA trascritto nelle cellule neoplastiche, questo studio indaga il primo tassello di un ben più ampio mosaico rappresentato dall'espressione genica, avendo come obiettivo quello di porre le basi biomolecolari per futuri studi volti a chiarire i passaggi successivi di un eventuale coinvolgimento di questo complesso meccanismo molecolare nella progressione neoplastica del meningioma di cane.

## **4. Il meningioma del cane: caratteri clinico-patologici generali**

### **4.1. Origine del meningioma**

L'encefalo ed il midollo spinale sono rivestiti dalle meningi, un sistema di membrane connettivali disposte in tre lamine concentriche e denominate, dall'esterno all'interno, dura madre, aracnoide e pia madre (Summers et al., 1994). Oltre ad una evidente funzione protettiva nei confronti del tessuto nervoso, le meningi fungono da guaina per le emergenze dei nervi cranici e spinali, rappresentano uno stroma di supporto per i vasi sanguigni ed individuano lo spazio subaracnoideo, un compartimento in cui circola il liquido cefalorachidiano (LCR) prima di essere riassorbito e di tornare al sangue (Summers et al., 1994). Da queste peculiari strutture prende origine il meningioma, il tumore primario del Sistema Nervoso Centrale (SNC) a più elevata incidenza nel cane (Snyder et al., 2006). In particolare è ormai noto che a dare origine al meningioma sia la proliferazione incontrollata delle cellule dell'aracnoide, lì dove esse si aggregano nella formazione dei villi aracnoidei (Riemenschneider et al., 2006).

Una delle caratteristiche distintive del meningioma è la sua ampia variabilità morfologica e fenotipica (Motta et al., 2012), che si giustifica alla luce dell'ontogenesi del tessuto da cui il tumore prende origine. Nei mammiferi, nel corso dello sviluppo embrionale, il mesenchima che circonda il tubo neurale subisce una trasformazione strutturale condensandosi a formare una membrana

chiamata meninge primordiale. Lo strato esterno di questa membrana si ispessisce a costituire la dura madre, mentre gli strati interni rimangono sottili e formano le leptomeningi (pia madre e aracnoide). Contemporaneamente le cellule delle creste neurali migrano all'interno delle leptomeningi contribuendo alla formazione definitiva dell'aracnoide (Ruggieri et al., 2006). Questa compartecipazione del mesoderma e delle creste neurali alla formazione delle cellule da cui origina il meningioma giustifica l'espressione di caratteri istologici francamente mesenchimali, così come di caratteri squisitamente neuroepiteliali da parte del tumore stesso (Summers et al., 1995).

#### **4.2 Incidenza, localizzazione ed aspetti macroscopici**

Il meningioma rappresenta il tumore primario del SNC di più frequente riscontro nel cane (Snyder et al., 2006). Esso è il primo tumore a sede intracranica con una incidenza che arriva al 45%, seguito dagli astrocitomi (17%), dagli oligodendogliomi (14%), dai tumori dei plessi corioidei (7%) e dai linfomi primitivi del SNC (4%) (Snyder et al., 2006).

Prendendo origine da strutture di rivestimento esterno del SNC, il meningioma è per definizione una neoplasia extra-assiale, ovvero si accresce nello spessore delle meningi ma fuori dal neurasse (encefalo e midollo spinale), sebbene quest'ultimo sia occasionalmente interessato da infiltrazione da parte delle cellule neoplastiche (Motta et al., 2012). La maggior parte dei meningiomi del cane si localizzano in prossimità del *calvarium*, a livello della regione olfattoria e

frontale, del pavimento della scatola cranica, del chiasma ottico o della regione soprasellare e parasellare (Patnaik et al., 1986; Snyder et al., 2006; Sturges et al., 2008); altre localizzazioni di frequente riscontro a livello intracranico sono la regione cerebello-pontomidollare (Bagley et al., 2000; Kaldrymidou et al., 2001; Kitagawa et al., 2004; Sturges et al., 2008; Holland et al., 2010), lo spazio retrobulbare (Patnaik et al., 1986; Willis et al., 1997; Pérez et al., 2005), e l'orecchio medio (Owen et al., 2004).

Sulla base di un criterio puramente anatomico, i meningiomi vengono così distinti:

- Meningioma olfattorio
  
- Meningioma della convessità
  
- Meningioma della falce
  
- Meningioma della base
  
- Meningioma del tentorio
  
- Meningioma intraventricolare

I meningiomi intraventricolari derivano presumibilmente da cellule meningiali residue presenti nella tela coroidea del sistema dei plessi (Meuten et al., 2002; Summers et al., 1995)

Nell'uomo la localizzazione di più frequente per il meningioma intracranico è rappresentata dalle convessità cerebrali, spesso in posizione parasagittale ed in associazione con la *falx cerebri* ed il seno venoso (Louis et al., 2007).

Quanto alla localizzazione spinale, nel cane sono più frequentemente interessati i segmenti cervicali e lombari (Petersen et al., 2008). Al contrario, nell'uomo la maggior parte dei meningiomi spinali si localizzano a livello toracico (Gottfried et al., 2003). Tale tendenza sembra essere legata al fatto in questo segmento è più elevata la concentrazione dei villi aracnoidei, le strutture meningiali da cui origina il meningioma (Kido et al., 1976). Nel cane la distribuzione dei villi aracnoidei lungo le meningi spinali non è ancora nota (Petersen et al., 2008).

Va ricordato, inoltre, che nel cane vengono riportati meningiomi extraneurali, localizzati all'interno dei seni paranasali (Patnaik et al., 1986). Una forma di meningioma extraneurale a sede eterotopica è il meningioma cutaneo noto nell'uomo, ma riportato aneddoticamente anche nel cane (Herrera et al., 1981). E' stato suggerito che i traumi e un'elevata pressione intracranica in una fase precoce dello sviluppo embrionale possano indurre lo spostamento eterotopico di tessuto meningiale dal quale successivamente originerebbero i meningiomi extraneurali (Suzuki et al., 1967). Secondo altre ipotesi il meningioma cutaneo potrebbe derivare da estensioni cutanee di neoplasie localizzate attorno ad organi di senso della testa e lungo il decorso di nervi cranici e spinali, o da estensioni di meningiomi dal SNC alla cute, attraverso l'invasione ossea o difetti dell'osso (Lopez et al., 1974). In alternativa alcuni autori ipotizzano possa

trattarsi non di reali meningiomi, ma di falsi meningiomi, ovvero di malformazioni simil-meningocele sviluppatasi in sede cutanea (Brantsch et al., 2009). L'unico caso riportato nel cane è stato descritto come una massa sottocutanea in corrispondenza dell'arto posteriore destro, non associato a nervi cranici o spinali, né tanto meno ad organi di senso cefalici, in assenza di meningiomi cerebrali primari che potessero far ipotizzare l'origine metastatica della massa sottocutanea (Herrera et al., 1981).

La maggior parte dei meningiomi appaiono macroscopicamente come delle neoformazioni ben delimitate e distinte dalle strutture circostanti, spesso multilobulate, dalla consistenza ferma o granulata (Summers et al., 1995). La presenza di emorragie può conferire al tumore un colore rossastro, mentre la mineralizzazione può conferire un aspetto sabbioso e calcareo in sezione, e una consistenza dura alla massa (Meuten et al., 2002). Talvolta il meningioma del cane mostra una cavità cistica centrale, individuata dalla confluenza di aggregati di cellule vacuolizzate o prodottasi in conseguenza di eventi ischemici (Pinna et al., 1986; Salvadori et al., 2010). In genere il meningioma mostra ampia base di impianto rispetto al tessuto meningiale, sebbene non sia raro il riscontro di tumori peduncolati (Summers et al., 1995); la dura madre prossima alla lesione appare spesso infiltrata dalle cellule neoplastiche, che possono raggiungere anche le ossa del cranio. In questa sede segni di iperostosi sono altamente indicativi di infiltrazione neoplastica (Louis et al., 2007). Nella sua crescita espansiva frequentemente il meningioma tende ad avvolgere e ad inglobare altre strutture intracraniche, come le arterie cerebrali, che spesso risultano

intrappolate nella massa neoplastica, o ad estendersi a compartimenti extracranici adiacenti, come le orbite (Louis et al., 2007).

### **4.3 Segnalamento e segni neurologici**

Il meningioma è una neoplasia che affligge con maggiore frequenza soggetti di età adulta o anziani, con un'età media di 11 anni (Snyder et al., 2006; Song et al., 2013) e con un picco di incidenza tra i 12 ed i 14 anni (Song et al., 2013). Occasionalmente tale entità neoplastica è stata diagnosticata anche in animali giovani, intorno al sesto mese o ad un anno di vita (Keller and Madewell, 1992). In un recente studio che prendeva in esame un'ampia serie di tumori intracranici nel cane, gli animali affetti da meningioma risultavano significativamente più anziani rispetto a quelli affetti da altre neoplasie intracraniche (Snyder et al., 2006). Anche nell'uomo il meningioma si presenta in soggetti anziani, con maggiore frequenza nella sesta o settima decade di vita (Louis et al., 2007); sebbene più rari, i meningiomi diagnosticati nei giovani e nei bambini mostrano una maggiore malignità istologica e tendono a manifestare un comportamento nettamente più aggressivo (Louis et al., 2007). Contrariamente rispetto all'uomo, in cui il sesso femminile appare maggiormente colpito da questo tipo di neoplasia intracranica, nella specie canina non viene osservata una predisposizione di sesso (Snyder et al., 2006; Sturges et al., 2008). In medicina umana si ipotizza che i meningiomi a localizzazione spinale manifestino una predilezione per il sesso femminile, tanto che dall'analisi di alcune serie di tumori

meningiali midollari la percentuale di donne risultava prossima al 90% (Louis et al., 2007). Nell'uomo il sesso maschile, sebbene meno frequentemente interessato, sviluppa in genere forme a più alto grado istologico (Burger et al., 2002).

Quanto alla razza, l'analisi di ampie serie di casi di meningioma di cane ha permesso nel tempo di individuare una predisposizione; in particolare, ad essere colpiti da questo tipo di neoplasia intracranica sono più comunemente soggetti di razza dolicocefala, quali Pastore Tedesco, Pastore Scozzese, Golden Retriever e Labrador Retriever (Zaki, 1977; Patnaik et al., 1986; Gavin et al., 1995; Bagley and Gavin, 1998; Withrow et al., 2007; Sturges et al., 2008; Wisner et al., 2011), così come cani di razza Boxer (Sturges et al., 2008). Al di là delle razze più comunemente affette, recentemente è stata osservata una maggiore incidenza del meningioma in soggetti dal peso compreso tra i 20 ed i 25 Kg (Song et al., 2013).

In virtù della loro tendenza a crescere in modo lento ed espansivo, i meningiomi risultano clinicamente silenti per lungo tempo prima di causare segni clinici apprezzabili dal proprietario del cane (Snyder et al., 2006). Inoltre, dal momento che risultano interessati soggetti anziani, la maggior parte dei segni clinici da coinvolgimento del prosencefalo, quali alterazioni dello stato mentale e del comportamento, vengono in genere interpretati dal proprietario come conseguenza del fisiologico processo di invecchiamento del loro cane (Snyder et al., 2006). La severità dei segni neurologici conseguenti lo sviluppo di un

meningioma intracranico dipendono comunque da diversi fattori, quali la velocità di crescita e la localizzazione della neoplasia, lo sviluppo di edema peritumorale, l'aumento della pressione intracranica e l'efficienza dei meccanismi compensatori cerebrali (Sessums and Mariani, 2009). In genere l'evoluzione dei segni clinici risulta lenta e progressiva dal momento che il meningioma si accresce in modo espansivo in posizione extra-assiale, al di fuori del parenchima cerebrale e spinale (Sessums and Mariani, 2009). Se i normali meccanismi compensatori encefalici, quali la diminuzione del volume ematico e del liquido cerebrospinale, vengono esauriti, i segni neurologici possono progredire in maniera più veloce, con rapido peggioramento della condizione clinica dell'animale (Oakley and Patterson, 2003). Così come per le altre lesioni cerebrali, i segni neurologici provocati dalla presenza di un meningioma intracranico nel cane sono determinati in primo luogo dalla localizzazione del tumore, e sono rappresentati principalmente da alterazioni dello stato di coscienza, crisi epilettiche e disfunzioni vestibolari (Greco et al., 2006; Snyder et al., 2006). È ormai noto che le crisi epilettiche vengano generate a livello di corteccia cerebrale e di diencefalo (Fischer et al., 2005), aree cerebrali frequentemente sede di sviluppo del meningioma (Snyder et al., 2006; Sturges et al., 2008). Dal momento che spesso i soggetti affetti da meningioma intracranico mostrano come unico segno neurologico la comparsa ricorrente di crisi convulsive, tale neoplasia deve essere considerata in diagnosi differenziale in tutti cani con più di 5 anni d'età con anamnesi di recente comparsa di manifestazioni epilettiche (Sessums and Mariani, 2009). Inoltre la compressione

o l'infiltrazione neoplastica delle strutture diencefaliche può essere responsabile dell'alterazione dello stato di coscienza che frequentemente viene riportato in cani affetti da meningioma, a causa del danneggiamento del sistema reticolare ascendente, una rete di neuroni responsabili del mantenimento dello stato vigile (De Lahunta and Glass, 2009). In aggiunta le medesime lesioni diencefaliche possono spiegare la comparsa di segni vestibolari dal momento che il talamo funge da stazione di trasmissione alla corteccia cerebrale degli stimoli vestibolari afferenti (Dieterich et al., 2005).

Lo sviluppo in sede spinale del meningioma si associa generalmente a atassia e paresi, dolorabilità spinale e, con minore frequenza, a zoppia ed incontinenza fecale ed urinaria (Petersen et al., 2008).

#### **4.4. Indagini di laboratorio**

Poche sono le conoscenze circa le modificazioni ematobiochimiche nei cani affetti da meningioma (Motta et al., 2012). Un parametro considerato clinicamente significativo e indagato negli ultimi anni in medicina umana e veterinaria è la concentrazione del lattato ematico. È noto che i processi patologici del SNC si associano all'aumento della produzione locale di acido lattico (Jordan et al., 1983; Watson and Scott, 1995), che viene poi riversato nel liquido cefalorachidiano (LCR) e da qui al sangue, in caso di alterazioni della barriera emato-encefalica (BEE), condizione di comune riscontro in corso di patologie intracraniche (Lobetti and Pearson, 1996; Sullivan et al., 2009).

L'aumentata produzione di acido lattico è una conseguenza dello stato ipossico del tessuto nervoso causato da patologie compressivo-ostruttive, con conseguente conversione metabolica verso la glicolisi anaerobia (Jones et al., 1993; Domingo et al., 1998). Durante lo sviluppo di meningioma così come di altre neoplasie intracraniche è stata dimostrata nell'uomo un'alterazione del metabolismo dei carboidrati (Herting et al., 2003). In uno studio del 2009, Sullivan e coll., nel valutare la concentrazione ematica di acido lattico in cani anestetizzati affetti da differenti patologie intracraniche, hanno descritto un incremento clinicamente significativo della lattatemia ( $>2,5$  mmol/l) nei soggetti affetti da meningioma (Sullivan et al., 2008).

Ben più indagate sono le modificazioni biochimiche e citologiche del LCR che si accompagnano alla presenza di meningioma intracranico e spinale nel cane (Bailey and Higgins, 1986; Dickinson et al., 2006; Snyder et al., 2006). Alcuni autori hanno riportato modificazioni patologiche del LCR pressoché costanti nei cani affetti da meningioma intracranico, con pleiocitosi ed aumento della concentrazione di granulociti neutrofili (Bailey and Higgins, 1986; Carrillo et al., 1986; Dickinson et al., 2006; Snyder et al., 2006). In particolare Bailey e Higgins hanno avanzato l'ipotesi che l'incremento dei granulociti neutrofili nel LCR potesse essere associato al grado di necrosi e di infiltrazione di polimorfonuclati osservata all'esame istopatologico (Bailey and Higgins, 1986), ipotesi confutata in successivi studi (Dickinson et al., 2006). Più recentemente, in uno studio retrospettivo che prendeva in esame i risultati dell'analisi biochimica e citologica del LCR in un'ampia serie di meningiomi intracranici di cane, pleiocitosi ed

incremento dei neutrofili sono state osservate solo nel 19% dei casi indagati (Dickinson et al., 2006). In questo studio è risultata altresì significativa l'associazione tra localizzazione del tumore ed aumento della componente cellulare infiammatoria, osservata nell'80% delle neoplasie localizzate nella porzione più caudale della fossa craniale (Dickinson et al., 2006). Tale correlazione potrebbe essere attribuibile al maggior grado di compressione e conseguente flogosi indotta dalla neoplasia in questa sede, così come alla vicinanza anatomica tra la lesione ed il sito di campionamento (Dickinson et al., 2006). Per quanto riguarda i meningiomi a localizzazione spinale, essi generalmente non si associano a modificazioni significative del LCR (Zaki et al., 1975; Gilmore, 1983; Fingeroth et al., 1987). In uno studio retrospettivo su 34 meningiomi spinali, l'analisi del liquor ha rivelato nella maggior parte dei casi un aumento della concentrazione proteica associata ad una moderata pleiocitosi (Petersen et al., 2008). Anche in questo studio tali alterazioni erano di più frequente riscontro nei tumori a localizzazione lombare, in prossimità del sito di raccolta del LCR, facendo supporre un aumento delle proteine e delle cellule infiammatorie in prossimità della lesione (Petersen et al., 2008).

#### **4.5 Aspetti radiografici**

Le avanzate metodiche di diagnostica per immagini, quali Tomografia Computerizzata (TC) e Risonanza Magnetica (RM), rappresentano ad oggi fondamentali ausili diagnostici per indagare i diversi processi patologici che

coinvolgono il SNC, sebbene per una diagnosi definitiva si debba ricorrere all'esame istologico (Motta et al., 2012).

Nell'uomo e nel cane l'accuratezza diagnostica della TC nell'identificazione di meningiomi intracranici è risultata prossima all'80% (Polizopoulou et al., 2004; Assefa et al., 2006; Sessums and Mariani, 2009). Purtroppo, nell'indagare neoplasie localizzate a livello di fossa caudale la TC produce numerosi artefatti, a causa dell'interferenza delle radiazioni emesse con l'osso petroso temporale (O'Brien and Axlund, 2005). Il segnale caratteristico prodotto dal meningioma in TC risulta da iso-intenso a lievemente iper-intenso ed omogeneo; con questa metodica si evidenziano con facilità eventuali foci di calcificazioni all'interno della neoplasia, caratteristica di comune riscontro nel meningioma, sebbene una mineralizzazione diffusa potrebbe mascherare l'intensità del segnale dopo infusione di mezzo di contrasto (Sessums and Mariani, 2009). Anche l'iperostosi delle strutture ossee adiacenti il meningioma risulta facilmente visualizzabile in TC (Morantz and Walsh, 1994; Halphin, 2000).

Ben maggiore è l'accuratezza diagnostica della RM, stimata fino al 96% per l'identificazione del meningioma nell'uomo (McDermott and Wilson, 1996; De Monte et al., 2001; Engelhard, 2001). In RM il meningioma mostra un segnale iso-intenso o ipo-intenso rispetto a quello della sostanza grigia, in sequenze pesate in T1, ed eterogeneamente iper-intenso in sequenze pesate in T2. Le immagini post-contrasto pesate in T1 lasciano apprezzare distinti margini tumorali con marcata captazione di contrasto, dal momento che i capillari della neoplasia non

attraversano la BEE (Sessums and Mariani, 2009). Dopo somministrazione endovenosa di mezzo di contrasto i meningiomi possono rivelare un segno radiografico caratteristico, noto come “dural tail”, letteralmente “coda durale” (Motta et al., 2012). Esso consiste nella captazione di mezzo di contrasto di entità analoga a quella della neoplasia a livello della porzione di dura madre prossima alla lesione, che spesso appare ispessita (Nagele et al., 1994; Graham et al., 1998). Nell’uomo questo segno radiografico è generalmente associato alla presenza di meningioma, ma non lo caratterizza. Infatti, esso può essere osservato anche in caso di glioblastoma, adenoma ipofisario e schwannoma acustico (Rokni-Yadzi and Sotoudeh, 2006). La RM permette di apprezzare adeguatamente anche le formazioni cistiche che spesso compaiono nel meningioma, soprattutto in immagini pesate in T2 (Morantz, 1994). Le caratteristiche radiografiche che in RM supportano una diagnosi di meningioma risultano dunque (Sessums and Mariani, 2009):

- localizzazione periferica rispetto al parenchima cerebrale
- dislocazione e compressione del tessuto nervoso generalmente senza infiltrazione
- segnale iso/ipointenso in sequenze pesate in T1
- segnale iperintenso in sequenze pesate in T2
- notevole e diffusa captazione di contrasto
- ispessimento durale
- prossimità e continuità anatomica con le meningi

È opportuno considerare che nel cane altre lesioni cerebrali possono mostrare il medesimo aspetto radiografico del meningioma, quali neoplasie ipofisarie (Pollard et al., 2010), linfoma (Thomovsky et al., 2011) sarcoma istiocitico cerebrale (Tamura et al., 2009) e tumore germinale intracranico (Motta et al., 2011).

Nonostante l'accuratezza diagnostica RM e TC non sono però in grado di predire invasività e caratteri di malignità del meningioma, non consentendo pertanto di avanzare ipotesi prognostiche (Sessums and Mariani, 2009). In medicina umana sono stati effettuati diversi studi di correlazione tra aspetti radiografici e grado istologico e/o sottotipo tumorale, con risultati contrastanti (Sturges et al., 2008). In particolare, in alcuni studi l'intensità del segnale nelle immagini pesate in T2 è apparsa correlata con il grado istologico del tumore (Elster et al., 1989; Chen et al., 1992; Suzuki et al., 1994; Maiuri et al., 1999). È stato inoltre riportato che meningiomi con iperintensità di segnale in entrambe le sequenze T1 e T2, esteso edema, necrosi centrale e bordi mal definiti, mostrano un comportamento più aggressivo e un più elevato grado istologico (Engelhard, 2001).

La diagnosi definitiva di meningioma è in ogni caso istologica. Essa può essere eseguita su materiale chirurgico o su materiale campionato attraverso biopsie stereotattiche TC-guidate, oggi realizzate anche nel cane. Su 18 cani con meningioma il 100% è stato correttamente diagnosticato utilizzando questa innovativa metodica (Koblik et al., 1999). In questo modo l'esame bioptico può

fornire utili informazioni prognostiche, consentendo di impostare la più adeguata strategia terapeutica (Sessums and Mariani, 2009).

#### **4.6. Classificazione istologica del meningioma in oncologia umana e veterinaria**

L'attuale sistema classificativo dei tumori del SNC degli animali domestici riconosciuto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), identifica per il meningioma del cane la forma benigna, di cui si descrivono otto varianti istologiche, e la forma anaplastica (Koestner et al., 1999). Tale classificazione, tuttavia, non prevede per questo tipo di tumore un sistema di *grading*. Vengono approfonditamente descritte le caratteristiche istomorfologiche di ciascuna delle varianti riconosciute, le quali, ad eccezione del meningioma anaplastico o maligno, mostrano generalmente un comportamento benigno ed una crescita lenta.

##### **Meningioma meningoteliale o sinciziale**

Variante istologica caratterizzata dalla presenza di lobuli solidi di cellule poligonali, definiti da sottili fibre collagene. Le cellule neoplastiche mostrano una modica quantità di citoplasma eosinofilo, con margini cellulari non ben definiti, nuclei rotondo-ovalari con cromatina finemente dispersa, e nucleoli piccoli o indistinti. L'indice mitotico è basso. Comuni sono le invaginazioni del citoplasma nei nuclei, con la formazione di figure pseudo-inclusionali. Occasionalmente si

possono osservare cellule giganti con nuclei eccentrici e bizzarri (Koestner et al., 1999).

### **Meningioma fibroblastico o fibroso**

Neoplasia costituita da cellule fusiformi disposte in lunghi fasci intrecciati. Le cellule neoplastiche sono ovoidali con scarso citoplasma eosinofilo dai margini indistinti, nucleo con cromatina finemente dispersa, nucleoli piccoli o indefiniti. Queste cellule sono separate le une dalle altre da variabile quantità di fibre collagene e di reticolina (Koestner et al., 1999).

### **Meningioma transizionale o misto**

Questo meningioma presenta caratteristiche istologiche riconducibili in parte alla forma meningoteliale, in parte a quella fibroblastica e, per questo motivo, è detto "transizionale". Vortici concentrici di cellule neoplastiche sono reperti comuni e si formano spesso intorno ai vasi capillari. Nella parte centrale di queste figure occasionalmente è presente la precipitazione di sali calcarei sotto forma di "corpi psammomatosi". La maggior parte dei meningiomi del cane appartiene a questa variante istologica (Koestner et al., 1999).

### **Meningioma psammomatoso**

Tale variante si contraddistingue per una diffusa presenza di figure a vortice, con un core centrale ialino concentricamente stratificato, spesso calcificato, le quali vanno a costituire i cosiddetti “corpi psammomatosi” (Koestner et al., 1999).

### **Meningioma angiomatoso**

È caratterizzato da numerosi vasi sanguigni di piccolo o medio calibro, associati alla presenza di nidi di cellule meningiali neoplastiche, in uno stroma ricco in reticolina. Il meningioma angiomatoso è una variante piuttosto rara negli animali domestici (Koestner et al., 1999). E' ancora poco chiaro se si tratti realmente di un meningioma o piuttosto di un tumore della parete vasale accresciutosi nei tessuti molli meningiali (Summers, de Lahunta, Cummings).

### **Meningioma papillare**

Tale variante istologica è costituita da cellule organizzate in strutture papillari e disposte intorno ad un core vascolare. In sede perivasale è caratteristica la presenza di una zona cell-free che anticipa le cellule neoplastiche conferendo un aspetto a pseudorosetta (Meuten et al., 2002). Questo tipo di meningioma, generalmente osservato nel cane, è raro negli altri animali domestici. Non esistono al momento studi che ne indaghino il comportamento biologico per

confrontarlo con la medesima variante dell'uomo, notoriamente aggressiva (Louis et al., 2007).

### **Meningioma a cellule granulari**

Esso è prevalentemente composto da cellule di forma ovale o poligonale con un abbondante citoplasma eosinofilo e granulare. Le granulazioni citoplasmatiche si colorano positivamente con la colorazione PAS anche dopo digestione con diastasi (Koestner et al., 1999).

### **Meningioma mixoide**

In questa variante istologica le cellule neoplastiche appaiono vacuolizzate e separate da una quantità modica o abbondante di matrice mixomatosa. Questa matrice appare positiva alle colorazioni PAS, alcian blue e mucicarminio. Nei cani istotipo sviluppa spesso nella fossa caudale e nella regione prossimale del midollo spinale (Koestner et al., 1999).

### **Meningioma anaplastico o maligno**

Il meningioma maligno esprime caratteri istologici tipici di malignità, quali frequenti mitosi, elevata cellularità, assenza di chiari pattern istologici, estesi

focolai di necrosi, infiltrazione del tessuto nervoso adiacente e, eventualmente, metastasi (Koestner et al., 1999).

Nell'uomo l'attuale sistema classificativo dei tumori del SNC riconosciuto dall'OMS classifica i meningiomi in tre gradi istologici: meningioma benigno (grado I), atipico (grado II) ed anaplastico (grado III) (Louis et al., 2007). I meningiomi benigni mostrano bassa attività mitotica < 4 mitosi /10 campi ad alto ingrandimento (HPF), e sono escluse da questa categoria determinate varianti istologiche, quali il meningioma papillare, rabdoide, cordoide e a cellule chiare. I meningiomi atipici possono mostrare alternativamente attività mitotica  $\geq 4$  mitosi /10HPF, presenza di invasione del parenchima adiacente o fino a tre delle seguenti caratteristiche istologiche: pattern di crescita solida; aumentata cellularità; elevato rapporto nucleo-citoplasma; macronucleoli; foci di necrosi spontanea. Per la diagnosi di meningioma anaplastico è richiesta la presenza di un elevato indice mitotico (>20 mitosi/HPF) associata ad una franca anaplasia cellulare (Louis et al., 2007). Tale sistema di gradazione scaturisce dalla correlazione delle caratteristiche istologiche con il comportamento biologico della neoplasia (Sturges et al., 2008). Dunque l'identificazione del grado istologico consente nell'uomo di avanzare attendibili ipotesi prognostiche (Kleihues et al., 2002; Louis et al., 2007). Sulla base della nota similarità tra meningioma del cane e dell'uomo, in passato sono stati compiuti diversi tentativi di applicare il sistema classificativo in uso in medicina umana al cane (Sturges et

al., 2008; Mandara et al., 2010), dimostrando l'applicabilità di tale gradazione e gettando le basi per futuri studi volti a chiarire la correlazione tra grado istologico e comportamento biologico anche nel meningioma di cane.

## **5. Vecchi presupposti e nuove frontiere per la comprensione del comportamento biologico del meningioma**

Nonostante l'elevata variabilità morfologica ed immunofenotipica espressa dal meningioma, il comportamento biologico attribuito a questo tumore, nell'uomo come negli animali, è generalmente benigno, ad eccezione del meningioma anaplastico, e associato piuttosto agli effetti secondari che esso produce sul tessuto nervoso adiacente (Gallagher et al., 1993; Gordon et al., 1994; Axlund et al., 2002; Bagley, 2004).

Criteri istopatologici da sempre utilizzati nella diagnostica morfologica di un tumore, quali elevata attività mitotica, ipercellularità, crescita solida e priva di modelli architetturali, necrosi estensiva, infiltrazione del tessuto nervoso adiacente e formazione di metastasi, restano ancora oggi dei punti fermi nella valutazione di malignità anche del meningioma (Koestner et al., 1999). Tuttavia, oggi più che in passato, nella valutazione del potenziale maligno del meningioma si rende indispensabile enfatizzare la differenza che può sussistere tra la malignità morfologica e quella biologica in senso stretto.

Infatti, sebbene la maggior parte dei meningiomi dell'uomo e degli animali domestici mostrino lievi caratteri morfologici di malignità, il comportamento biologico che essi manifestano dipende essenzialmente dalla loro localizzazione e dagli effetti secondari che la massa esprime, ovvero da quegli effetti che il tumore produce nel parenchima nervoso strettamente adiacente o lontano dalla massa. Tali effetti sono rappresentati dall'edema perilesionale o regionale, dalla

neovascolarizzazione e dalla necrosi, dalla compressione e infiltrazione, dalle recidive, da un possibile idrocefalo secondario, dallo spostamento della linea mediana e dalla tendenza a produrre erniazioni di tessuto nervoso, fino alla metastatizzazione al di fuori del neurasse, evento ben documentato nell'uomo anche per le forme istologicamente benigne (Fulkerson et al., 2008), ma solo aneddótico nel cane (Schulman et al., 1992).

Dunque è giusto chiedersi se e quando la malignità morfologica coincida con quella biologica del tumore e quali aspetti morfologicamente rilevabili possano assumere un sicuro valore prognostico. Attualmente, a fronte di una più comune benignità morfologica del tumore, si è alquanto concordi nel ritenere che parlare di malignità biologica significa per un meningioma essenzialmente fare riferimento alla capacità del tumore di recidivare ed all'entità dell'edema peritumorale che ad esso spesso si associa e causa, insieme al tumore stesso, un aumento della pressione intracranica ed erniazioni encefaliche.

Per tentare di associare la malignità morfologica al comportamento biologico del meningioma da anni ricercatori di tutto il mondo indagano possibili marker biologici sul tessuto neoplastico, siano essi riferibili agli effetti primari (indice mitotico, recettori ormonali, progressione maligna) o agli effetti secondari del tumore (neovascolarizzazione, infiltrazione, edema peritumorale) (Goldman et al., 1997; Kalkanis et al., 1996; Provias et al., 1997; Paek et al., 2002; Platt et al., 2006; Dickinson et al., 2008).

### **5.1. Meningioma e ormono-dipendenza**

Nello studio del comportamento biologico del meningioma, sin dalla prima metà del novecento, ha cominciato a farsi strada in medicina umana l'ipotesi di una possibile ormono-dipendenza. Nel 1938, infatti, Cushing e Eisenhardt osservarono una evidente progressione dei sintomi legati allo sviluppo del tumore in donne in gravidanza (Cushing and Eisenhardt, 1938). Da allora molti autori hanno riportato casi di meningioma a decorso inusualmente molto rapido in gestanti (Mealey and Carter, 1968; Rushing et al., 1999), così come casi di miglioramento clinico dopo il parto e di nuovo peggioramento nel corso di una successiva gravidanza (Bickerstaff et al., 1958; Kempers and Miller, 1963). Più tardi fu individuata una significativa correlazione tra lo sviluppo del meningioma e quello del carcinoma mammario, in cui la presenza di recettori per estrogeni (RE) e progesterone (RP) veniva in quegli anni ampiamente dimostrata (Donnell et al., 1979).

Nel meningioma dell'uomo i primi studi sperimentali in grado di dimostrare la presenza di recettori per gli estrogeni risalgono al 1979 e la loro concentrazione risultò più elevata nei campioni prelevati da donne in periodo fertile e comparabile a quella osservata in carcinomi mammari sensibili all'ormono-terapia (Donnell et al., 1979). Studi successivi si concentrarono sulla ricerca parallela dei RE e RP su frazioni citosoliche e frazioni nucleari mediante l'uso di ormoni radioattivi, con risultati alquanto contraddittori (Cahill et al., 1984; Schulman et al., 1992). Ad oggi l'applicazione di metodiche che prevedono l'uso

di anticorpi specifici ad alta affinità ha permesso di identificare nel fenotipo RE-/RP+ quello più frequentemente espresso nel meningioma dell'uomo (Blankenstein et al., 2000). La presenza di RE è stata osservata nell'8.6% dei meningiomi, con localizzazione citoplasmatica e nucleare (Hsu et al., 1997), mentre la presenza di RP viene riportata nell'82.9% dei casi e tende a ridursi proporzionalmente alla progressione neoplastica del tumore (Cahill et al., 1984). Inoltre l'espressione di RE indipendente dalla stimolazione ormonale, contrariamente a quanto osservato in tessuti ed organi target di tali ormoni, quali utero e tube uterine, ha fatto avanzare l'ipotesi che i RE prevalgano in forma inattiva, incapace cioè di unirsi al proprio ligando. Ciò fa sospettare che la loro espressione venga sottostimata, in quanto gli anticorpi utilizzati riconoscono il dominio proteico del recettore deputato al legame con l'ormone, evidentemente assente nelle forme inattive (Blankenstein et al., 2000).

I risultati riguardanti la concentrazione dei recettori steroidei nei meningiomi umani sono apparsi da subito molto interessanti nell'ambito di una valutazione prognostico-terapeutica del tumore. In particolare, se da un lato la presenza dei RE è stata considerata scarsamente sfruttabile da un punto di vista terapeutico, dall'altro i risultati riguardanti la concentrazione dei RP hanno fatto presupporre che una terapia antiprogestonica potesse essere tentata nell'approccio medico del meningioma, così come viene già da tempo praticata in pazienti affetti da carcinoma mammario, aprendo incoraggianti prospettive nella cura di questo tumore. In particolare la terapia ormonale antiprogestonica permetterebbe di rallentare la crescita del tumore, nei casi in cui non sia possibile l'intervento

chirurgico, o di rallentarne la comparsa di recidiva in caso di asportazione parziale (Grunberg et al., 1991). Inoltre l'impiego della terapia antiprogesterinica in sede preoperatoria potrebbe ridurre la vascolarizzazione del tumore facilitandone la rimozione chirurgica. Diverse molecole antiprogesteriniche sono state sottoposte a sperimentazione, in particolare mifepristone e onapristone (Blankenstein et al., 2000). Ricerche su animali da laboratorio (Matsuda et al., 1994) e studi pilota coinvolgenti un limitato numero di pazienti (Grunberg et al., 1991; Lamberts et al., 1992; Grunberg, 1994) hanno portato a risultati incoraggianti, sebbene non si possano ancora trarre conclusioni definitive circa l'efficacia di tali molecole (Blankenstein et al., 2000).

Anche in medicina veterinaria abbiamo oggi a disposizione dati interessanti riguardanti le molecole recettoriali per gli ormoni steroidei sessuali nelle cellule neoplastiche di meningioma. I primi dati risalgono al 1990, quando Speciale e collaboratori individuarono RE e RP, rispettivamente in un caso e in due casi di meningioma di cane (Speciale et al., 1990). Più recentemente è stato indagato il valore prognostico dell'espressione di RP nel meningioma di cane (Théon et al., 2000). Nei soggetti che avevano subito un'asportazione parziale, è stata osservata una positività immunoistochimica nucleare ai RP nel 70% dei casi ed una negatività ai RE in tutti i tumori esaminati (Théon et al., 2000). Nel medesimo studio non è stata osservata alcuna correlazione tra la presenza dei recettori ormonali ed età, sesso, stato fisiologico e riproduttivo dei soggetti, sottotipo istologico e localizzazione del tumore (Théon et al., 2000). È stata altresì osservata una correlazione inversa tra positività immunoistochimica

all'antigene nucleare di proliferazione cellulare ( $PF_{PCNA}$  index) e presenza di RP, lasciando supporre una correlazione tra l'espressione dei recettori ormonali ed il comportamento del tumore (Théon et al., 2000). Tali risultati sono stati confermati in successivi studi, in cui l'espressione dei RE è risultata solo occasionale e blanda, a differenza di quella dei RP, quest'ultima correlata in maniera inversa all'attività proliferativa delle cellule neoplastiche (Mandara et al., 2002; Adamo et al., 2003). Si delinea dunque per i RP il ruolo di affidabile fattore prognostico nella valutazione del comportamento biologico del meningioma di cane, oltre che di possibile target terapeutico di notevole importanza (Mandara et al., 2002).

## **5.2. Meningioma ed attività telomerasica**

Nel fisiologico processo d'invecchiamento delle cellule eucariote un importante ruolo è svolto dai telomeri, brevi sequenze nucleotidiche ripetitive poste nelle porzioni terminali dei cromosomi (Yazawa et al., 1999; Ahmed and Tollefsbol, 2003) e necessarie per la replicazione e per il mantenimento dell'integrità degli stessi. Nei mammiferi la sequenza telomerica ripetuta è (TTAGGG) $_n$  (Nasir et al., 2001). I telomeri si accorciano ad ogni successiva divisione cellulare determinando una progressiva instabilità genomica e l'innescò di apoptosi, attraverso una via p53 dipendente o mediante meccanismi alternativi (Nasir et al., 2001). L'integrità di tali importanti strutture è garantita dalla telomerasi, un enzima polimerasico ribonucleoproteico costituito da una componente ad RNA e

da un complesso multiproteico, che comprende una subunità ad azione trascrittasi inversa (TERT) (Meyerson, 2000; Argyle and Nasir, 2003; Maes et al., 2006). L'attività della telomerasi è considerata essenziale per la conservazione dell'estremità dei cromosomi, in quanto è in grado di aggiungere sequenze nucleotidiche TTAGGG ai telomeri e di prolungare così la sopravvivenza cellulare (Blackburn, 1991; Nasir et al., 2001; Yazawa et al., 1999). Negli ultimi anni la comunità scientifica ha mostrato notevole interesse circa il ruolo delle telomerasi nello sviluppo e progressione delle neoplasie. L'attività telomerasica è fisiologicamente rilevabile nelle cellule in continua replicazione, quali cellule emopoietiche e germinali, ma risulta assente nelle cellule somatiche differenziate (Nasir et al., 2001; Argyle and Nasir, 2003). L'enzima risulta altresì attivo nelle linee cellulari immortalizzate e nella maggior parte delle neoplasie maligne dell'uomo, il che lascia supporre per la telomerasi un ruolo cruciale nei fenomeni di cancerogenesi e di immortalizzazione delle cellule neoplastiche (Mandrioli et al., 2007).

Una chiara analogia strutturale è stata osservata fra la proteina TERT dell'uomo e quella di cane (Yazawa et al., 1999) ed una sovraespressione di tale enzima è stata evidenziata in differenti neoplasie maligne umane ed animali (Biller et al., 1998; Yazawa et al., 1999; Poremba et al., 2000), compresi i meningiomi intracranici (Maes et al., 2007). In particolare numerosi studi hanno dimostrato un'attività telomerasica elevata nei meningiomi maligni e bassa o assente nei meningiomi benigni (Rushing et al., 1999; Falchetti et al., 2002; Boldrini et al., 2003; Maes et al., 2005). Inoltre è stata osservata nei meningiomi benigni

recidivanti una più elevata attività telomerasica rispetto a quelli benigni non recidivanti (Maes et al., 2005).

Negli ultimi anni l'attività telomerasica è stata indagata anche nei meningiomi di cane (Mandrioli et al., 2007; Long et al., 2006). In uno studio del 2006, Long e collaboratori hanno valutato l'immunoreattività alla trascrittasi inversa telomerasica umana (h-TERT) in un campione di 27 meningiomi di cane dimostrando che l'espressione dell'enzima appare correlato in maniera significativa all'attività proliferativa delle cellule neoplastiche (Long et al., 2006). Nel 2007 nuovi dati sono stati pubblicati circa l'espressione della telomerasi in meningioma di cane e di gatto, in relazione all'istotipo e all'indice di replicazione del tumore (Mandrioli et al., 2007). In questo studio inaspettatamente l'espressione della telomerasi è risultata maggiore nei meningiomi di gatto, rispetto a quelli di cane, notoriamente a comportamento più aggressivo rispetto alla neoplasia felina; ciò potrebbe suggerire un diverso ruolo che la telomerasi svolge nelle due specie e, pertanto, un differente significato prognostico (Mandrioli et al., 2007). In questo studio la presenza dell'enzima è stata riscontrata, come atteso, a livello nucleare e nucleolare, sebbene occasionalmente l'enzima abbia mostrato anche localizzazione citoplasmatica (Mandrioli et al., 2007). L'immunoreattività nucleare può essere spiegata con la presenza del complesso enzimatico attivo a livello delle estremità cromosomiche (Mandrioli et al., 2007) mentre la positività nucleolare deriverebbe dal processo di assemblaggio dell'oloenzima telomerasico, processo che si verifica proprio a livello del nucleolo (Mandrioli et al., 2007). Infine, la sua presenza nel citoplasma

potrebbe essere associata allo spostamento dell'oloenzima telomerasi dal nucleo al citoplasma, e quindi di nuovo verso il nucleo, durante il processo di assemblaggio (Long et al., 2006). In questo studio non è stata osservata alcuna relazione significativa tra l'espressione della telomerasi e il tipo istologico del meningioma, né con l'attività proliferativa della neoplasia (Mandrioli et al., 2007). Per spiegare tali risultati è stato ipotizzato che l'attivazione della telomerasi, evento di indiscussa importanza nella cancerogenesi, possa avvenire indipendentemente dal segnale di proliferazione, attribuendo alle cellule una capacità di crescita illimitata (Maes et al., 2007).

### **5.3. Meningioma e molecole di adesione**

I meccanismi di adesione cellulare sono di fondamentale importanza per la morfogenesi e per il mantenimento delle omeostasi tissutali (Bex and van Roy, 2009) ed un ruolo decisivo in tal senso è svolto da molecole appartenenti alla superfamiglia delle caderine (Bex and van Roy, 2009). Negli ultimi anni la comunità scientifica ha mostrato notevole interesse nei confronti di questa classe di molecole, indagandone l'espressione in diversi tipi di neoplasie. È noto, infatti, che durante l'oncogenesi l'architettura dei tessuti ed i meccanismi di adesione tra le cellule che li compongono sono minati da modificazioni genetiche ed epigenetiche a tal punto che la stessa capacità infiltrante e di metastatizzazione di una neoplasia viene ormai attribuita al fallimento di tali meccanismi (Bex and van Roy, 2009).

Nella superfamiglia delle caderine la più indagata è sicuramente la caderina E, una proteina transmembranaria calcio-dipendente, deputata alla mediazione di un legame intercellulare omofilo (Hazan et al., 2004); il dominio intercellulare di tale molecola è legato ad una componente intracitoplasmatica, la  $\beta$  catenina, che la connette direttamente i filamenti di actina del citoscheletro (Maruyama et al., 2000; Van Aken et al., 2001; Brunner et al., 2006). Recenti studi dimostrano la diminuzione dell'espressione della caderina E nelle neoplasie di origine epiteliale, in maniera proporzionale al grado di malignità, fino alla sua totale scomparsa nelle neoplasie più aggressive, lasciando intravedere un ruolo anti-invasivo ed anti-metastatico per tale molecola (Berx and van Roy, 2009). Recentemente l'espressione della caderina E è stata indagata anche nel meningioma (Panagopoulos et al., 2008; Ide et al., 2011; Mandrioli et al., 2011), sebbene con risultati non sempre tra loro concordi (Figarella-Branger et al., 1997; Shimada et al., 2005; Brunner et al., 2006; Pećina-Slaus et al., 2010; Zhou et al., 2010; Nagaishi et al., 2012). Mentre in passato non era stata osservata alcuna correlazione tra espressione della caderina E e grado istologico (Figarella-Branger et al., 1997; Shimada et al., 2005; Mandrioli et al., 2011), studi più recenti hanno dimostrato una riduzione della sua immunoreattività nei meningiomi maligni (Zhou et al., 2010; Ide et al., 2011; Nagaishi et al., 2012), evento ritenuto oggi responsabile della invasività dei meningiomi di alto grado (Zhou et al., 2010). Recentemente, inoltre, è stata osservata una correlazione tra la ridotta immunoreattività alla caderina E e lo sviluppo di edema peritumorale (Zhou et al., 2010). Per spiegare tale evento è stata ipotizzata l'esistenza nelle cellule

meningiali neoplastiche di un meccanismo inibente l'espressione della caderina E, e pertanto responsabile della riduzione dell'adesione cellulare, danneggiamento dell'interfaccia tra neoplasia e parenchima cerebrale così come della barriera ematoencefalica (Zhou et al., 2010). Di conseguenza le cellule neoplastiche possono infiltrare l'encefalo e aggravare l'edema cerebrale (Zhou et al., 2010). Quanto ai meningiomi di cane, l'espressione della caderina E è stata indagata da diversi ricercatori, con risultati estremamente variabili in termini di percentuale di cellule positive (Ramos-Vara et al., 2010; Ide et al., 2011; Mandrioli et al., 2011); in ogni caso non è stata osservata una espressione significativamente diversa tra meningiomi benigni e meningiomi maligni (Ide et al., 2011; Mandrioli et al., 2011). Inoltre, mentre nell'uomo la caderina E è espressa soprattutto dal meningioma meningoteliale, e talvolta assente nel meningioma fibroblastico (Schwechheimer et al., 1998; Falchetti et al., 2002), nel cane e nel gatto non è stata osservata alcuna relazione tra espressione di caderina E e istotipo (Ramos-Vara et al., 2010).

Recentemente la perdita dell'espressione della caderina E è stata osservata in associazione all'aumentata espressione della caderina N o caderina neuronale in carcinomi mammari, prostatici e nei melanomi dell'uomo (Hsu et al., 1996; Hazan et al., 1997; Sandig et al., 1997; Sanders et al., 1999; Tomita et al., 2000). Questo fenomeno è noto come "*cadherin switching*" e fa parte di una serie di modificazioni che si verificano nei tumori di origine epiteliale e che vengono nel complesso indicate come "*epithelial to mesenchymal transition*" (EMT) (Hazan et al., 2004). In particolare la caderina N media l'interazione omofilica tra le cellule

neoplastiche e altri tessuti che esprimono tale molecola, come lo stroma (Hazan et al., 1997) e l'endotelio (Hazan et al., 2000), facilitando il processo di metastatizzazione e di infiltrazione neoplastica (Hazan et al., 2004). Il possibile ruolo del fenomeno dell'EMT nella progressione neoplastica dei meningiomi è stato oggetto di numerosi studi (Figarella-Branger et al., 1994; Ide et al., 2011; Pecina-Slaus et al., 2012), con risultati non ancora conclusivi. Infatti, mentre è ormai nota la riduzione dell'espressione della caderina E al progredire del grado istologico (Pecina-Slaus et al., 2012), non è ancora chiaro il ruolo esatto ricoperto dalla caderina N. Al momento, sia nel meningioma umano che in quello di cane, si ritiene che le cellule neoplastiche meningiali mostrino una espressione complementare di caderina E e caderina N, non correlata al sottotipo istologico (Ide et al., 2011) e che la variazione del profilo di espressione delle molecole di adesione con riduzione della caderina E ed aumento della espressione della caderina N possa facilitare l'infiltrazione delle cellule neoplastiche nel parenchima cerebrale circostante (Ide et al., 2011).

Oltre a quella delle caderine, è ormai acquisizione comune che altre classi di molecole di adesione sono implicate nella progressione neoplastica. Tra queste un ruolo decisivo è svolto dalla superfamiglia delle integrine (Figarella-Branger et al., 1997). Le integrine sono  $\alpha$ - $\beta$  eterodimeri e vengono raggruppate in tre gruppi:  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 (integrine leucocitarie),  $\beta$ 3 (citoadesine). Le integrine  $\beta$ 1 agiscono come recettori di superficie che legano le proteine della matrice extracellulare e vengono anche denominate VLA integrine (*very late activation* – VLA), in quanto inizialmente identificate come le proteine prodotte dai linfociti T nella fase

tardiva di attivazione (Albelda, 1993; Hynes, 1992). Di questo gruppo di molecole fanno parte sei componenti, denominate da VLA 1 a VLA 6 in base al tipo di subunità  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ) che si lega con la subunità  $\beta 1$  e che risulta responsabile della specificità di legame (Figarella-Branger et al., 1997). In particolare VLA 1, 2 e 3 mostrano affinità di legame per il collagene, VLA 3, 4 e 5 per la fibronectina e VLA 1, 2 e 6 per la laminina (Hemler, 1990; Hynes, 1992; Albelda, 1993). Nel meningioma umano e nei villi aracnoidei normali è stata indagata l'espressione della VLA 2, 5 e 6 (Figarella-Branger et al., 1997). Mentre la VLA 5 è risultata espressa sia in cellule meningiali normali che in quelle neoplastiche, indipendentemente dal grado istologico della neoplasia, VLA 2 e 6 sono preferenzialmente espresse dai meningiomi di alto grado (Figarella-Branger et al., 1997). I villi aracnoidei, al contrario, non mostra alcuna immunoreattività nei confronti di tali molecole (Figarella-Branger et al., 1997). Questi risultati sono stati considerati indicativi della capacità del meningioma di modificare il proprio pattern di espressione delle integrine al progredire del grado istologico (Figarella-Branger et al., 1997).

Un possibile ruolo svolto nella progressione neoplastica è stato ipotizzato anche per la molecola CD44 (Picker et al., 1989), ritenuta responsabile dell'adesione ed invasione *in vitro* delle cellule neoplastiche di glioma umano (Merzak et al., 1994). La glicoproteina CD44 può essere espressa in diverse isoforme, prodotte dalla modificazione post-traduzionale della molecola standard (CD44s) (Screaton et al., 1992; Rudy et al., 1993). CD44 viene espressa da una grande varietà di cellule e agisce principalmente come *homing receptors* dei linfociti circolanti e

come molecola di adesione delle cellule epiteliali (Haynes et al., 1989). Nel suo ruolo di molecola di adesione, il CD44 media il legame tra le cellule che la esprimono ed i componenti della matrice extracellulare, quali collagene, fibronectina ed acido ialuronico (Carter and Wayner, 1988; Aruffo et al., 1990). Considerando che la fibronectina è la maggior componente della matrice extracellulare nelle meningi come nei meningiomi (NG and Wong, 1993) e che l'acido ialuronico è presente nello spazio extracellulare dell'encefalo adulto (Bignami and Asher, 1992), è stato ipotizzato un coinvolgimento di tale molecola nella invasività e progressione neoplastica del meningioma (Figarella-Branger et al., 1997). Nel meningioma umano CD44 risulta espresso maggiormente nell'istotipo meningoteliale ed un alto livello di espressione è stato riscontrato nei meningiomi di alto grado, i quali mostrano generalmente una maggiore tendenza ad invadere il parenchima cerebrale adiacente (Figarella-Branger et al., 1997).

Tutti questi dati, considerati nel loro insieme, dimostrano come le molecole di adesione godano di uno specifico pattern di espressione che varia in relazione al sottotipo ed al grado istologico, con importanti implicazioni clinico-patologiche e biologico-comportamentali, tutte meritevoli di ulteriori indagini.

#### **5.4. Meningioma, edema peritumorale e Vascular Endothelial Growth Factor**

Nonostante il meningioma venga considerato un tumore a lenta crescita e dal basso grado di malignità istologica, spesso il decorso clinico dei soggetti colpiti è gravemente influenzato dalla presenza di edema peritumorale (EPT), effetto secondario frequentemente prodotto dalla neoplasia durante la sua evoluzione (Hou et al., 2013). Nei pazienti umani affetti da meningioma intracranico è nota l'associazione tra EPT e la comparsa di crisi convulsive pre- e post-operatorie (Lieu and Howng, 2000; Vignes et al., 2008). In passato diversi studi hanno tentato di correlare la presenza di EPT con diversi aspetti clinico-patologici del tumore, quali età, sesso, localizzazione e dimensioni della neoplasia (Gilbert et al., 1983; Bradac et al., 1986; Inamura et al., 1992; Brandis et al., 1993; Lobato et al., 1996; Bitzer et al., 1998), sottotipo istologico (Gilbert et al., 1983; Go et al., 1988; Inamura et al., 1992; Lobato et al., 1996), vascolarizzazione (Bitzer et al., 1997), attività secretoria (Philippon et al., 1984) ed espressione dei recettori degli ormoni sessuali (Benzel and Gelder, 1988; Brandis et al., 1993; Donnel et al., 1979), con risultati tra loro contraddittori. Alcuni autori affermano che il tipo istologico e le dimensioni del tumore non influiscono significativamente sulla formazione di EPT nei meningiomi (Paek et al., 2002). Tuttavia, gli stessi hanno anche confermato una significativa correlazione tra la localizzazione dei meningiomi e l'EPT (Paek et al., 2002); in particolar modo i meningiomi del lobo frontale o della base frontotemporale si associano ad un EPT più esteso, mentre nei meningiomi soprasellari, della regione petrosa, occipitali o della fossa posteriore l'edema peritumorale risulta assente o comunque di scarso rilievo

(Paek et al., 2002). Bitzer e colleghi hanno anche osservato come la localizzazione del tumore in sede frontotemporale sia quella associata alla più elevata incidenza dell'edema peritumorale nei meningiomi (Bitzer et al., 1997).

Per spiegare lo sviluppo di EPT nei meningiomi sono state proposte 4 teorie:

1. Teoria escretoria-secretoria, secondo la quale meningiomi di diversi sottotipi istologici producono inclusioni eosinofile e PAS-positivo, che vengono successivamente secrete come materiale proteico perivasale (Smith et al., 1981; Alguacil-Garcia et al., 1986). Tale materiale indurrebbe la formazione di edema sia direttamente attraverso un meccanismo osmotico, che indirettamente mediante un meccanismo ancora da chiarire (Bradac et al., 1986). A sostegno di questa teoria si pone la nota associazione esistente tra il sottotipo secretorio di meningioma e lo sviluppo di grave EPT (Regelsberger et al., 2009; Wang et al., 2013). Tale teoria, tuttavia, non spiega la presenza di EPT nei sottotipi istologici in cui non vi sono evidenze di un'attività secretoria (Hou et al., 2013).
2. Teoria della compressione cerebrale, secondo la quale le dimensioni del tumore rivestirebbero un ruolo decisivo nello sviluppo di EPT, in quanto responsabili della compressione del parenchima cerebrale circostante, con conseguente ischemia ed edema citotossico (Gilbert et al., 1983; Maiuri et al., 1987; Ildan et al., 1999;). Tuttavia, l'assenza di correlazione tra dimensioni del tumore e EPT più volte documentata (Maiuri et al.,

1987; Inamura et al., 1992; Lee et al., 2008; Paek et al., 2002), non sostiene sufficientemente questa tesi. Per questo motivo l'effetto compressivo andrebbe considerato come un fattore aggravante piuttosto che come un evento determinante nello sviluppo di EPT (Hou et al., 2013).

3. Teoria della compressione vascolare, secondo la quale l'EPT sarebbe prodotto dalla compressione/occlusione delle vene cerebrali e dei seni venosi della dura madre da parte della massa neoplastica. Sebbene tale teoria sia stata direttamente smentita da Bitzer e colleghi (Bitzer et al., 1998), appare evidente che la compressione dei seni venosi possa comunque alterare l'emodinamica locale con aggravamento dell'EPT preesistente (Higgins et al., 2008; Hou et al., 2013).
4. Teoria idrodinamica, secondo la quale l'EPT si verifica come conseguenza della congestione intratumorale (Hou et al., 2013). Tale ipotesi viene supportata dalla dimostrata correlazione tra lo presenza di un grave EPT e lo scarso sviluppo del sistema venoso di drenaggio della neoplasia (Tanaka et al., 2006). Secondo questa teoria, a causa dell'ipossia e dell'inadeguatezza del flusso sanguigno, le cellule neoplastiche secernono fattori pro-angiogenici con formazione di vasi sanguigni immaturi caratterizzati da elevata permeabilità, con conseguente fuoriuscita di plasma nell'interstizio tumorale. L'edema è a sua volta responsabile del rigonfiamento della neoplasia e dell'ulteriore ostacolo al drenaggio venoso, con conseguente aumento della pressione e congestione

intratumorale ed ulteriore accumulo di fattori angiogenici (Hou et al., 2013). Inoltre, tali fattori angiogenici vengono rilasciati nel parenchima cerebrale circostante, inducendo formazione di nuovi vasi sanguigni e edema anche nel tessuto peritumorale (Hou et al., 2013).

Considerando che la teoria idrodinamica risulta al momento la più accreditata per spiegare lo sviluppo di EPT nel meningioma (Salpietro et al., 1994; Sanson and Cornu, 2000), appare evidente l'importanza del ruolo svolto dai fattori angiogenici nel determinismo di un così grave effetto secondario. Diversi studi hanno identificato nel *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) la principale molecola responsabile dell'angiogenesi e dell'aumento della permeabilità vasale nel meningioma (Samoto et al., 1995; Yoshioka et al., 1999; Hou et al., 2013). Il VEGF è un fattore proangiogenico ipossia-indotto che agisce come potente induttore della crescita, proliferazione e permeabilità delle cellule endoteliali, coinvolto in processi fisiologici e patologici (Scheidegger et al., 1999; Harrigan, 2003). Nell'uomo il gene che codifica per il VEGF è costituito da 8 esoni (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Robinson and Stringer, 2001). Di esso sono state identificate 9 isoforme, prodottesi in seguito a *splicing* alternativo. VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>162</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>165b</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> e VEGF<sub>206</sub> sono le principali isoforme prodotte dal maggior numero di tipi cellulari, di cui la VEGF<sub>165</sub> è la più espressa sia nelle cellule normali che in quelle che hanno subito una trasformazione neoplastica (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Robinson and Stringer, 2001). Le principali isoforme di VEGF si legano all'eparan-solfato dei proteoglicani di superficie con affinità variabile. Infatti, la VEGF<sub>121</sub> è liberamente

diffusibile, circa la metà della VEGF<sub>165</sub> secreta resta legata, mentre quasi tutta la VEGF<sub>189</sub> rimane sequestrata nella matrice extracellulare (Dickinson et al., 2008). Nel cane sono state descritte cinque isoforme di VEGF: VEGF<sub>120</sub>, VEGF<sub>144</sub>, VEGF<sub>164</sub>, VEGF<sub>182</sub>, VEGF<sub>188</sub> (Dickinson et al., 2008). Queste isoforme hanno approssimativamente il 95% di omologia con la sequenza amminoacidica di quelle umane e, similmente alla maggior parte dei mammiferi, mancano di un singolo residuo amminoacidico nella regione N-terminale se comparate a quelle umane (Dickinson et al., 2008). Esistono tuttavia pochi dati che descrivono l'espressione di ogni isoforma di VEGF nei tessuti del cane, sebbene tutti i dati disponibili suggeriscano che VEGF<sub>120</sub>, VEGF<sub>164</sub> e VEGF<sub>188</sub> siano le isoforme più abbondanti, come in altre specie di mammiferi (Dickinson et al., 2008). Queste ultime tre isoforme rilevate mediante RT-PCR e sequenziamento, si sono rivelate le più importanti nel carcinoma polmonare del cane (Scheidegger et al., 1999). Ogni singola isoforma giocherebbe un ruolo distintivo nel rimodellamento vascolare e nello sviluppo di vasi venosi e arteriosi; tuttavia, il ruolo di ogni specifica isoforma nei tessuti neoplastici rimane ancora oscuro (Dickinson et al., 2008).

Per quanto concerne l'attività biologica del VEGF, tale molecola agisce stimolando la ossido nitrico (NO) sintetasi delle cellule endoteliali, con produzione di NO che a sua volta attiva la cascata angiogenica (Bouloumié et al., 1999; Ferrara, 2000), ed inducendo la produzione di proteasi da parte delle cellule endoteliali, necessarie per la degradazione della membrana basale durante la formazione di nuovi vasi sanguigni (Platt et al., 2006). Inoltre, il VEGF

induce un aumento della permeabilità alle proteine plasmatiche a livello di capillari e venule, di entità 50000 volte superiore all'effetto prodotto dall'istamina (Senger et al., 1990). Tale aumento di permeabilità vasale risulta dall'effetto diretto esercitato dal VEGF sulle cellule endoteliali, dalla mobilizzazione del calcio intracitoplasmatico endoteliale e dall'aumento del numero di fenestrazioni e di vescicole pinocitotiche che è in grado di stimolare nelle stesse cellule dell'endotelio (9 da 20). L'espressione di VEGF è regolata da una vasta gamma di fattori, quali la necrosi e l'ipossia, fattori di crescita come il *transforming growth factor* (TGF) e il *fibroblast growth factor* (FGF), citochine, tra cui l'interleuchina-1 $\alpha$  e l'interleuchina-6, onco-geni o geni oncosoppressori come il Ras e il TP53 (Machein and Plate, 2000; Ferrara et al., 2003) l'insulina, il *platelet-derived growth factor*, l'*epidermal growth factor*, il TNF $\alpha$ , e l'ossido nitrico (Harrigan, 2003). L'ipossia è probabilmente il fattore che gioca il ruolo più importante nell'indurre l'espressione di VEGF in considerazione del fatto che l'espressione di VEGF è più alta nei tumori con ampie aree necrotiche. In questi casi sembra che l'ipossia possa indurre un incremento nella trascrizione del gene che codifica per il VEGF e stabilizzare il suo prodotto mRNA, responsabile della presenza di una forte immunoreattività colorimetrica in prossimità delle regioni necrotiche dei tumori maligni (Ikeda et al., 1995).

I primi a sospettare un ruolo del VEGF nel determinismo dell'EPT nel meningioma di uomo furono Kalkanis e colleghi nel 1996 (Kalkanis et al., 1996), i quali misero in relazione l'espressione del mRNA del VEGF con il livello di EPT osservato in risonanza magnetica, dimostrando un notevole aumento dell'espressione del

VEGF nei tumori caratterizzati da marcato EPT. Da quel momento numerose ulteriori ricerche hanno indagato tale correlazione nel meningioma umano (Goldman et al., 1997; Provias et al., 1997; Yoshioka et al., 1999; Paek et al., 2002; Pistoiesi et al., 2002; Otsuka et al., 2004; Ding et al., 2008; Sakuma et al., 2008; Schmid et al., 2010; Nassehi et al., 2011; Nassehi et al., 2013) confermando l'importante ruolo del VEGF.

Nel cane ad oggi i risultati sul rapporto tra l'espressione del VEGF e il comportamento biologico del meningioma sono alquanto contraddittori. Secondo alcuni autori, infatti, non ci sarebbe alcuna relazione tra l'espressione di VEGF e l'EPT, né tantomeno tra edema peritumorale e indice di proliferazione cellulare MIB-1 (Dickinson et al., 2008; Matiasek et al., 2009). Inoltre, non è stata osservata alcuna relazione tra l'entità dell'EPT, valutato in Risonanza Magnetica, e l'indice di sopravvivenza degli animali (Platt et al., 2006). Altri autori, tuttavia, hanno dimostrato una correlazione inversa tra l'espressione del VEGF e il tempo di sopravvivenza, in cani sottoposti ad asportazione chirurgica del tumore e successiva radioterapia; in particolare, meningiomi in cui l'espressione del VEGF era  $\leq 75\%$  dell'area del tumore erano correlati ad una sopravvivenza di 748 giorni rispetto ai 442,5 giorni per i tumori con espressione di VEGF  $>75\%$  (Platt et al., 2006).

## **5.5. Anomalie cromosomiche e profili di espressione genica del meningioma**

Una volta raggiunto l'obiettivo del sequenziamento del genoma umano e animale, con la conseguente identificazione del potenziale biologico di ciascun organismo, la comunità scientifica internazionale ha focalizzato la propria attenzione sulle complesse e multiple anomalie genetiche responsabili della genesi tumorale. In questo contesto si pone in primo luogo l'analisi citogenica, ovvero lo studio delle anomalie cromosomiche in corso di malattia neoplastica. Il riconoscimento di anomalie cromosomiche ricorrenti in soggetti affetti da una determinata neoplasia rappresenta una strategia per localizzare e identificare geni associati allo sviluppo e alla progressione del tumore (Courtay-Cahen et al., 2008). Nel meningioma di uomo sono state compiute indagini cromosomiche, che hanno messo in luce molteplici alterazioni, molte delle quali sembrano associate al grado istologico della neoplasia (Dumanski et al., 1990; Lopez-Gines et al., 2004; Perry et al., 2004; Pfisterer et al., 2004; Pfisterer et al., 2008). Studi citogenetici hanno dimostrato che le aberrazioni del cromosoma 22 rappresentano le più comuni anomalie geniche del meningioma umano (Ruttledge et al., 1994; Weber et al., 1997; Dumanski et al., 1987), lasciando supporre che i geni coinvolti nel determinismo di tale patologia neoplastica risiedano proprio in quello specifico cromosoma (Courtay-Cahen et al., 2008). In particolare, nel cromosoma 22 dell'uomo si trova il gene della Neurofibromina 2 (NF2) le cui mutazioni sono responsabili della Neurofibromatosi di tipo 2, patologia caratterizzata dalla predisposizione geneticamente determinata allo sviluppo di neoplasie multiple, prevalentemente a livello del Sistema Nervoso

Centrale, tra cui il meningioma (Ruttledge et al., 1994; Wellenreuther et al., 1995; Hansson et al., 2007). Nei meningiomi di primo grado che non mostravano aberrazioni del cromosoma 22 sono state dimostrate delezioni subcromosomiche a livello dei cromosomi 1p e 3p (Carlson et al., 1997). Tuttavia, la maggior parte delle anomalie cariotipiche si riscontrano nei meningiomi di alto grado (Lekanne Deprez et al., 1995; Weber et al., 1997; Ozaki et al., 1999). Le neoplasie di secondo grado mostrano spesso delezioni a carico dei cromosomi 1p, 6q, 10, 14q, 18q e 22q, in aggiunta ad amplificazioni a carico dei cromosomi 1q, 9q, 12q, 15q, 17q, 20q (Weber et al., 1997; Ozaki et al., 1999). I meningiomi di terzo grado, al contrario, sembrano caratterizzati da delezioni a carico dei cromosomi 6q, 9p, 10 e 14p (Rempel et al., 1993; Simon et al., 1995; Weber et al., 1997), verosimilmente poiché le regioni interessate da tali anomalie contengono geni *oncosoppressori* coinvolti nel determinismo e nella progressione della neoplasia (Courtay-Cahen et al., 2008). Nel 2008 è stato compiuto uno studio volto ad indagare eventuali anomalie cromosomiche in cani affetti da meningioma (Courtay-Cahen et al., 2008). Sebbene si trattasse di un'analisi eseguita su una piccola serie di casi, le delezioni cromosomiche osservate ricadevano nelle regioni 10q23.1 e 17q22-q23, le quali mostravano sintonia condivisa con le regioni più frequentemente delete nei pazienti umani affetti da meningioma e contenute nei cromosomi 22 e 1p (Dumanski et al., 1987; Lindblom et al., 1994; Ruttledge et al., 1994; Simon et al., 1995; Weber et al., 1997; Hansson et al., 2007; Courtay-Cahen et al., 2008). Questo parallelismo lascerebbe supporre l'esistenza di geni orloghi coinvolti in entrambe le specie

nel determinismo del meningioma (Courtay-Cahen et al., 2008). Inoltre, nel medesimo studio fu osservata una correlazione diretta tra presenza di gravi anomalie cromosomiche e riduzione del tempo di sopravvivenza (Courtay-Cahen et al., 2008).

Nonostante l'enorme apporto scientifico fornito dagli studi citogenici, per meglio comprendere gli eventi molecolari coinvolti nella trasformazione neoplastica delle cellule appare essenziale indagare l'attività funzionale di una cellula tumorale, e come essa si differenzia rispetto a quella di una cellula normale. Risponde a questa esigenza l'analisi dell'espressione genica, intesa come l'indagine qualitativa e quantitativa dei geni trascritti in un dato momento da una cellula, per creare un'immagine globale della funzione cellulare (Ramaswamy, 2004). In passato lo studio dell'espressione genica veniva affrontato sulla base del criterio 'un esperimento, un gene', adatto per chiarire singoli processi biologici. Attualmente, invece, si tende a indagare come dal singolo genoma vengano estratte informazioni differenti nei diversi tessuti e processi patologici attraverso tecniche di biologia molecolare avanzata, come la tecnologia dei microarray di DNA (Aarhus et al., 2011). L'approccio sperimentale dei microarray permette, con un singolo test, una ricognizione a livello dell'intero genoma, senza la necessità di formulare un'ipotesi a priori sui geni coinvolti nel fenomeno studiato (Aarhus et al., 2011). I profili di espressione genica prodotti dall'esperimento con i microarray fungono da base per identificare geni candidati per un successivo studio attraverso l'applicazione di tecniche di biologia più tradizionali (Northern blot, Western blot, RT-PCR, transfezione genica, ecc)

(Aarhus et al., 2011). L'enorme potenziale scientifico delle tecnologie basate sui microarray ne giustifica l'impiego in diversi campi di ricerca, primo tra tutti quello oncologico. Nell'ultimo decennio, numerosi studi hanno indagato con queste metodiche il profilo di espressione genica del meningioma umano (Watson et al., 2002; Fathallah-Shaykh et al., 2003; Sasaki et al., 2003; Lusic et al., 2005; Wrobel et al., 2005; Sayagués et al., 2006; Carvalho et al., 2007; Aarhus et al., 2008; Claus et al., 2008; Lillehei et al., 2008; Hankins et al., 2008; Castells et al., 2009; Fèvre-Montange et al., 2009; Aarhus et al., 2011). Le prime ricerche avevano come obiettivo primario la ricerca di specifici geni responsabili della progressione neoplastica. In uno dei primi studi venne dimostrata l'attivazione di specifiche vie di segnale nel meningioma umano rispetto al controllo, in particolare della via Wnt, MAP chinasi, PI3K e notch (Fathallah-Shaykh et al., 2003). Pochi anni dopo, Wrobel e collaboratori dimostrarono la sovraespressione nei meningiomi di alto grado di alcuni geni responsabili della proliferazione cellulare e della regolazione del ciclo cellulare, così come di geni coinvolti nelle vie di segnale Wnt e IGF (Wrobel et al., 2005). Successivamente, sulla base del maggior numero di sonde a cDNA disponibili, le ricerche si sono concentrate sull'identificazione di una specifica "firma" genetica del meningioma umano e sull'analisi della variabilità genetica tra meningiomi di diverso grado (Carvalho et al., 2007). In questo modo sono state identificate nell'uomo consistenti differenze nei tre gradi istologici (Lusic et al., 2005; Carvalho et al., 2007; Fèvre-Montange et al., 2009), così come da una parte la *down-regulation* del gene oncosoppressore WWOX, dall'altra la *up-regulation* dell'oncogene TYMS (Aarhus et al., 2008). Più recentemente Perez-

Magan e coll. hanno comparato tutti i profili di espressione genica del meningioma riportati in letteratura, arrivando a identificare un profilo specifico legato a un più elevato tasso di recidiva (Pérez-Magán et al., 2012).

Analizzando lo stato dell'arte sui profili di espressione genica del meningioma umano ciò che colpisce è che le numerose ricerche non portano a risultati univoci (Serna et al., 2013). Ciò potrebbe trovare giustificazione nell'esistenza nei meningiomi di molteplici gruppi molecolari (Serna et al., 2013) motivo per cui tali neoplasie andrebbero verosimilmente raggruppare, oltre che in base ad un mero grado istologico, anche sulla base dei risultati statistici di natura molecolare (Serna et al., 2013). Infatti, l'osservazione che il 20% dei meningiomi dell'uomo istologicamente benigni mostrino un comportamento clinico aggressivo e tendenza alla recidiva anche dopo resezione completa, rappresenta una sfida sia per il patologo che per il neurochirurgo (Perry et al., 1999). Tale variabilità nell'ambito del meningioma umano è stata recentemente affrontata nell'ottica del concetto di "aggressività metabolica", che si pone certamente come nuova frontiera nella ricerca oncologica (Serna et al., 2013). Oggi, infatti, si ritiene che il maggiore motore della progressione neoplastica sia rappresentato dalla riprogrammazione delle vie metaboliche delle cellule neoplastiche (Serna et al., 2013). Partendo da questi presupposti, Serna e coll. hanno suddiviso una serie di meningiomi di uomo benigni ed atipici in gruppi metabolici, sulla base di specifici profili metabolici determinati mediante *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, confrontando successivamente i diversi profili di espressione genica dei sottogruppi così individuati con i dati clinici

(Serna et al., 2013). Grazie a tale correlazione gli autori hanno dimostrato che un sottogruppo di meningiomi benigni con un maggior tasso di recidiva post-operatoria mostravano un profilo metabolico e di espressione genica differente rispetto a quello degli altri meningiomi istologicamente benigni non recidivanti, più simile a quello dei meningiomi atipici (Serna et al., 2013). In particolare, in tale sottogruppo l'analisi genetica mostrava un'augmentata espressione di geni coinvolti in processi metabolici potenzialmente responsabili dell'aggressività di tale sottogruppo di neoplasie (Serna et al., 2013). In particolare, risultava aumentata l'espressione del gene della colina chinasi di tipo  $\beta$  (CHKBB), in associazione all'aumento dei livelli di colina, ben noto marker di proliferazione cellulare, suggerendo un ruolo del processo di fosforilazione della colina nell'aggressività metabolica di tale sottogruppo di meningiomi benigni (Serna et al., 2013). Allo stesso modo, risultava sovraespresso il gene codificante per la Taurina (TUG1), un composto dalle note proprietà antiossidanti (Green et al., 1991) e del quale si sospetta un potenziale ruolo antiapoptotico (Leon et al., 2009). Inoltre, risultavano sovraespressi i geni codificanti per il recettore dell'*insulin-like growth factor 1*, fattore di crescita dall'importante ruolo nella progressione tumorale (24 da 30) ed il fattore di trascrizione LMO3 (Serna et al., 2013).

Recentemente, sono state applicate metodiche di microarray anche nella ricerca oncologica veterinaria (Hulanicka et al., 2014; Thomson et al., 2005). In uno studio del 2005 Thomson e coll., al fine di dimostrare la validità del modello canino per lo studio dei tumori intracranici dell'uomo, ha analizzato il profilo di

espressione di una serie di neoplasie cerebrali di cane, mediante un microarray appositamente progettato e contenente 4000 sonde di cDNA specifiche per il tessuto cerebrale, comprendenti 25 oncogeni (Thomson et al., 2005). Gli autori indentificarono una serie di geni con un pattern di espressione analogo nella specie umana e canina, lasciando supporre che i tumori intracranici di cane vadano incontro a modificazioni molecolari simili a quelle osservate nell'uomo (Thomson et al., 2005). Questa similitudine fu confermata anche per il meningioma. Ad esempio, è stata osservata una sovraespressione delle proteine ribosomiali nella neoplasia rispetto al tessuto meningiale normale, proprio come descritto in medicina umana (Fathallah-Shaykh et al., 2003). Al contrario, è stata riscontrata la *down-regulation* del gene codificante per la proteina CREG, evento non riportato nel meningioma umano. Tale proteina, legandosi al *mannose-6-fosfato/insulin-like growth factor II*, inibisce la crescita cellulare (Di Bacco and Gill, 2003; Thomson et al., 2005). La ridotta espressione di tale gene nel meningioma rispetto alle meningi normali faciliterebbe la proliferazione neoplastica (Thomson et al., 2005).

Ulteriori analisi del profilo di espressione genica del meningioma di cane sono state compiute anche con metodiche di biologia molecolare più tradizionali (Dickinson et al., 2009). In particolare, nel 2009 Dickinson e collaboratori hanno indagato l'espressione di una serie di geni oncosoppressori, quali Neurofibromina 2 (NF2), il gene codificante per la proteina 4.1B (4.1 B), ed il gene *tumor suppressor in lung cancer-1* (TSLC1), mediante metodica di real-time

PCR retrotrascrizionale, dimostrandone la *down-regulation* e lasciando pertanto supporre un loro ruolo nella genesi tumorale (Dickinson et al., 2009).

## **6. Le metalloproteinasi di matrice (MMPs) e dei loro inibitori tissutali (TIMPs): regolatori del microambiente tumorale e della progressione neoplastica.**

Nei tessuti le cellule aderiscono tra di loro e alla matrice extracellulare (MEC) che le circonda, preservando in questo modo l'integrità del tessuto e la sua architettura tridimensionale (Gumbiner, 1996; Nelson and Bissell, 2006). Tutto ciò rappresenta un paradigma di fondamentale importanza per il mantenimento di un'adeguata fisiologia tissutale (Brooks et al., 2010). In corso di malattia neoplastica le cellule tumorali manifestano una minore tendenza all'adesione e un comportamento migratorio, il quale contribuisce alla formazione di metastasi ed all'invasione dei tessuti circostanti, eventi cardine nella progressione di una neoplasia (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). Affinché le cellule tumorali possano invadere i tessuti adiacenti e i vasi sanguigni, dando così vita a foci metastatici, è necessaria la degradazione della MEC che le circonda, la cui integrità rappresenta un ostacolo alla mobilizzazione cellulare (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). Rispondono a tale esigenza le metalloproteinasi di matrice (MMPs), endopeptidasi la cui funzione principale è quella di rimodellare la MEC attraverso un'attività proteolitica selettiva (Stetler-Stevenson, 2008; Kessenbrock et al., 2010). Nell'ultimo decennio, diversi studi hanno indagato la correlazione tra espressione di MMPs e progressione neoplastica, individuando per tali molecole un importante ruolo nella invasione e metastatizzazione tumorale (Kachra et al., 1999; Nordqvist et al., 2001; Paek et al., 2002; Perret et al., 2002; Stamenkovic, 2003; Roy et al., 2009). Nel *turnover* della MEC le MMPs non giocano, tuttavia, un ruolo da soliste. Ad esse, infatti, si contrappone

l'attività di un'altra classe di molecole, note come inibitori tissutali delle metalloproteinasi di matrice (TIMPs). Tali molecole agiscono da inibitori endogeni dell'attività proteasica delle MMPs, partecipando attivamente al rimodellamento della MEC e, di conseguenza, ricoprendo anch'esse un importante ruolo nella progressione neoplastica. Si ritiene, infatti, che alla base della progressione di una neoplasia primaria ben localizzata verso una forma invasiva e metastatica, vi sia un'alterazione del fisiologico rapporto tra MMPs/TIMPs, che risulterebbe sbilanciato a favore dell'attività proteasica (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). Di conseguenza, in corso di malattia neoplastica, lo studio delle modificazioni dell'espressione di MMPs e TIMPs, oltre che del loro rapporto reciproco, potrebbe rivelare importanti implicazioni prognostiche e terapeutiche (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010).

### **6.1. La matrice extracellulare (MEC) e il microambiente tumorale.**

Nei tessuti le cellule sono circondate da una matrice connettivale di supporto, composta da distinte famiglie di proteine fibrose altamente specializzate, quali fibronectine, laminine, collagene, proteoglicani (PGs) e tenascine (Jones and Jones, 2000; Kadler et al., 2008; Durbeej, 2010; Gordon and Hahn, 2010; Schaefer and Schaefer, 2010). Tale matrice extracellulare non fornisce un supporto meramente strutturale alle cellule, ma, al contrario, rappresenta una componente dinamica che partecipa attivamente al determinismo delle specifiche funzioni ed attività delle cellule che vi si trovano immerse (Hynes,

2009). In condizioni fisiologiche l'interazione inefficace o assente tra le cellule e la circostante MEC viene ritenuta responsabile di un tipo di morte cellulare nota come *anoikis*, un meccanismo a cui divengono resistenti molte cellule neoplastiche, noto anche come *adhesion-independent growth* (Sakamoto and Kyprianou, 2010; Sakuma et al., 2010). L'interazione tra le cellule e la matrice che le circonda appare come un processo dinamico, una sorta di dialogo bidirezionale che coinvolge molteplici ligandi e recettori, seguito dalla trasduzione all'interno delle cellule dello specifico segnale che ne deriva, dall'attivazione della cromatina, e, infine, dalla modificazione dell'espressione genica cellulare (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). A sua volta, la modificata espressione genica delle cellule può esprimersi con la secrezione di specifiche molecole in grado di modificare la stessa matrice circostante (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010), evento cardine in molteplici processi fisiologici, quali la maturazione del tessuto, nonché la proliferazione e differenziazione cellulare (Grolewska et al., 2012). Tale modello di reciprocità dinamica non si applica solamente a organi e tessuti in condizioni fisiologiche, ma sembra svolgere un importante ruolo anche nel corso delle diverse patologie che li affliggono (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). In particolare, in corso di patologia neoplastica, l'interazione tra le cellule tumorali e la MEC determinerebbe in quest'ultima delle modificazioni a loro volta responsabili dell'attivazione di specifiche risposte da parte dell'organismo, come ad esempio la formazione di nuovi vasi sanguigni, che contribuirebbero alla progressione neoplastica (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). Inoltre, alcune componenti della MEC

avrebbero delle potenzialità biologiche nascoste, utili ai fini della progressione neoplastica, ma attivabili solo in seguito a degradazione enzimatica da parte delle proteasi secrete dalla cellule tumorali (Amălinei et al., 2007). Ad esempio, molte delle proteine presenti nella MEC contengono dei domini che possono fungere da fattori di crescita e che divengono solubili ed attivi solo in seguito a degradazione delle proteine stesse (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). Il ruolo dell'interazione tra cellule neoplastiche e MEC nella progressione tumorale è stato indagato in diverse neoplasie. Ad esempio, è stato osservato che le cellule neoplastiche di carcinoma depongono laminina-332 nella MEC, la quale interagisce con il collagene di tipo VII, favorendo la mobilizzazione delle cellule stesse (Marinkovich, 2007; Waterman et al., 2007). Nei melanomi il condroitin-solfato della MEC sembra interagire con le integrine di membrana delle cellule neoplastiche con conseguente attivazione dell'*Erk pathway* (Yang et al., 2009). Tutto ciò dimostra quanto le stesse cellule tumorali, attraverso un'interazione dinamica con la circostante MEC, siano in grado di creare uno specifico microambiente, favorevole al loro ulteriore sviluppo e progressione (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010).

## **6.2. Struttura e attività biologica di MMPs e TIMPs.**

Le metalloproteinasi di matrice (MMPs) comprendono un'ampia famiglia di endopeptidasi zinco-dipendenti collettivamente capaci di degradare le diverse componenti della MEC (Amălinei et al., 2007). Questi enzimi, noti anche col

nome di matrixine, appartengono alla superfamiglia delle metzincine, caratterizzata dalla presenza di un atomo di zinco nel centro attivo del sito catalitico, seguito da un residuo conservato di metionina (Gomis-Rüth, 2009). In particolare le MMPs hanno una struttura complessa a domini multipli, costituita da un prodominio, un dominio catalitico, una regione “cerniera” e un dominio emopexina (Visse and Nagase, 2003). Il dominio catalitico contiene un sito di legame altamente conservato in cui è presente un atomo di zinco, e risulta connesso al dominio emopexina C-terminale mediante la regione “cerniera”, ricca in prolina (Overall, 2002). Tale complessa struttura è responsabile della specificità di legame delle MMPs e media l’interazione tra le proteasi e i loro inibitori endogeni (Overall, 2002).

Le MMPs furono scoperte circa 50 anni fa e identificate come agenti responsabili del processo di riassorbimento della coda nelle rane durante la metamorfosi (Gross, 2004). Oggi è stato ampiamente chiarito l’importante ruolo svolto da tali molecole in diversi processi fisiologici, quali proliferazione e motilità cellulare, guarigione delle ferite, angiogenesi, oltre che in molteplici eventi legati alla riproduzione dei mammiferi, quali ovulazione, involuzione uterina, impianto degli embrioni e proliferazione dell’endometrio (Curry and Osteen, 2003; Folgueras et al., 2004; Hashizume, 2007).

Sulla base della specificità di substrato, della sequenza amminoacidica che le costituisce e dell’organizzazione strutturale dei domini, le MMPs dei vertebrati

vengono tradizionalmente suddivise in sei categorie (Brummer et al., 2002; Marchenko et al., 2003; Visse and Nagase, 2003) (Fig.1):

1. Collagenasi [collagenasi-1 (MMP-1), collagenasi-2 (MMP-8) e collagenasi-3 (MMP-13)], proteasi neutre in grado di degradare il collagene fibrillare di tipo I, II, III, V e XI della MEC. Tali molecole sono composte da tre catene polipeptidiche disposte ad individuare una conformazione a tripla elica che le rende resistente alla degradazione da parte di altre proteasi (Owen et al., 2004).
2. Gelatinasi (MMP-2, MMP-9), composte da tre moduli di fibronectina di tipo II, i quali individuano uno stabile e compatto dominio di legame per il collagene (Folgueras et al., 2004). Tali molecole sono in grado di degradare il collagene di tipo IV, V, VII, X, XI e XVI, oltre che la gelatina (collagene denaturato), l'elastina, il core proteico dei proteoglicani, la proteina basica della mielina, la fibronectina, la fibrillina-1 e, infine, i precursori del TNF- $\alpha$  e IL-1b (Amălinei et al., 2007).
3. Stomalisine [stromalisina-1 (MMP3), stromalisina-2 (MMP-10) e stromalisina-3 (MMP-11)], costituiscono una classe di enzimi capaci di degradare il collagene di tipo IV e IX, la laminina, la fibronectina, l'elastina e i proteoglicani (Visse and Nagase, 2003).
4. Matrilisine [matrilisina-1 (MMP-7) e matrilisina-2 (MMP-26)], molecole caratterizzate dall'assenza del dominio emopexina, capaci di degradare, oltre a varie componenti della MEC, anche alcune molecole localizzate

sulla superficie cellulare, quali pro- $\alpha$ -defensina, il ligando del recettore Fas, pro-TNF- $\alpha$  e la E-caderina (Li et al., 2006).

5. Metalloproteinasi di membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24, MMP-17, MMP-25), proteine transmembrinarie o ancorate alla superficie cellulare, la maggior parte delle quali agiscono attivando la pro-MMP-2 (Amălinei et al., 2007).
6. Altre metalloproteinasi (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27, MMP-28), ovvero molecole con caratteristiche differenti dalle altre MMPs e che, pertanto, non possono essere incluse nelle precedenti categorie (Groblewska et al., 2012).

MMP Member	Common name/ Synonym	Cellular Localization	Domain structure
MMP1	Collagenase-1/ Interstitial collagenase	Secreted	
MMP8	Collagenase-2/ Neutrophil collagenase		
MMP13	Collagenase-3		
MMP2	Gelatinase A/ 72kDa gelatinase		
MMP9	Gelatinase B/ 92kDa gelatinase		
MMP12	Macrophage metalloelastase		
MMP7	Matrilysin/ Uterine		
MMP26	Matrilysin-2/ Endometase		
MMP14	MT1-MMP	TM type I	
MMP15	MT2-MMP		
MMP16	MT3-MMP		
MMP24	MT5-MMP		
MMP17	MT4-MMP		
MMP25	MT6-MMP/ Leukolysin		
MMP3	Stromelysin-1/ progelatinase	Secreted	
MMP10	Stromelysin-2		
MMP11	Stromelysin-3		
MMP28	Epilysin		
MMP18	Collagenase 4		
MMP19	RASI-1		
MMP20	Enamelysin		
MMP27			
MMP21	MMP-23A		
MMP22	MMP23B	TM type II	

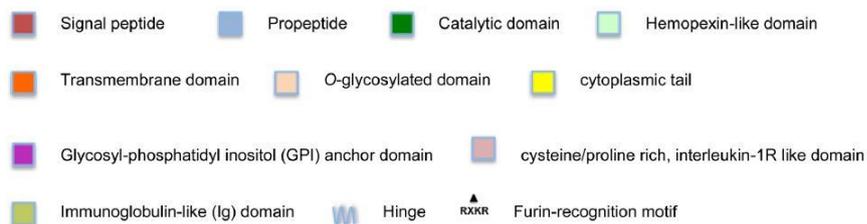


Figura 1. Struttura delle MMPs

Nella famiglia delle MMPs le gelatinasi rappresentano la categoria maggiormente indagata, specialmente nel campo di ricerca oncologica (Brew and Nagase, 2010; Groblewska et al., 2012). La ragione di tale interesse va ricercata principalmente nella spiccata capacità che queste molecole hanno, più di altre MMPs, di degradare il collagene che compone la membrana basale e la MEC, evento considerato fondamentale nella progressione neoplastica (Zeng et al., 1999). In particolare la MMP-2 (gelatinasi A) degrada selettivamente il collagene di tipo IV, che rappresenta il maggiore costituente della membrana basale, oltre ad altre componenti della MEC (Patterson et al., 2001). La MMP-2 è costituzionalmente espressa da diversi tipi cellulari, quali fibroblasti, cheratinociti, cellule endoteliali, condrociti, osteoblasti e monociti (Hashizume, 2007). La MMP-9 (gelatinasi B) agisce sul dominio N-terminale del collagene di tipo I, rivestendo un ruolo fondamentale nel rimodellamento della MEC (Amălinei et al., 2007). Questa gelatinasi viene prodotta in condizioni fisiologiche dai macrofagi alveolari, dai leucociti polimorfonucleati, dagli osteoclasti e dai cheratinociti (Hashizume, 2007).

Le metalloproteinasi sono sintetizzate inizialmente in forma di zimogeni, vale a dire un proenzima che necessita di attivazione (Shiomi and Okada, 2003). Quello dell'attivazione post-traduzionale rappresenta solo uno dei passaggi che portano alla formazione di MMPs funzionalmente attive e che rappresentano altrettanti livelli di regolazione nel controllo dell'attività di tali molecole. In particolare l'espressione delle MMPs viene regolata a quattro livelli: 1) espressione genica, 2) secrezione, 3) attivazione del proenzima o zimogeno, 4) inibizione dell'enzima

attivato (Amălinei et al., 2007). Diverse sostanze, quali fattori di crescita, ormoni, citochine o sostanze presenti nella MEC inducono la trascrizione dei geni che codificano per le MMPs, agendo su specifici fattori di trascrizione che, a loro volta, si legano alle regioni AP (*activator protein*) -1 dei geni promotori (Amălinei et al., 2007). L'avvenuta trascrizione della molecola di mRNA non necessariamente comporterà la sua traduzione in proenzima; in questa fase post-trascrizionale, infatti, i microRNA (miRNA), piccole molecole di acido ribonucleico non codificante, operano una fine regolazione dell'espressione delle MMPs (Small et al., 2010; Moore and Crocker, 2012). I miRNA agiscono tramite accoppiamento-base con sequenze complementari delle molecole di RNA messaggero (mRNA), cui segue il silenziamento genico tramite repressione traduzionale o degradazione della molecola bersaglio (Bartel, 2004). Per ciascuna MMP sono stati identificati i corrispondenti miRNA; in particolare, MMP-2 è regolata da miR-29b e miR-21, MMP-9 da miR-29b e miR-491-5P, mentre MMP-13 è regolata da miR-27b (Akhtar et al., 2010; Chen et al., 2011; Yan et al., 2011). Una volta che il mRNA viene tradotto nelle pro-MMPs, tali proenzimi vengono secreti nell'ambiente extracellulare, in attesa dell'attivazione (Amălinei et al., 2007). Alcuni di tali zimogeni, tuttavia, posseggono delle specifiche sequenze nella porzione C-terminale che li rendono suscettibili di una attivazione intracellulare da parte di specifici enzimi, noti come convertasi *furin-like* (Zucker et al., 2003). Subiscono questo destino la MMP-11, MMP-23, MMP-28 e le sei MT-MMPs, che vengono secrete dalla cellula direttamente in forma attiva (Amălinei et al., 2007). Per tutte le altre MMPs, secrete come zimogeni,

l'attivazione avviene nello spazio extracellulare da parte di particolari sostanze, quali specifici agenti denaturanti e composti a base di mercurio, i quali reagiscono con il residuo di cisteina che copre il sito catalitico del proenzima (Lijnen, 2001). Dall'esposizione del sito catalitico deriva infine il clivaggio del propeptide da parte delle proteasi presenti nello spazio pericellulare con formazione dell'enzima funzionalmente attivo (Amălinei et al., 2007). Fa eccezione la pro-MMP-2 che viene convertita nella sua forma attiva direttamente a livello della superficie cellulare da parte delle MT-MMPs (Morrison et al., 2001; Nie and Pei, 2003; Zucker et al., 2003). L'ultimo livello di regolazione dell'attività delle MMPs è l'inibizione dell'enzima attivato, di cui sono responsabili inibitori non specifici presenti nello spazio extracellulare, quali  $\alpha$ 2-macroglobulina e inibitore  $\alpha$ 1 delle proteasi, o inibitori specifici, noti come TIMPs, inibitori tissutali delle metalloproteasi di matrice (Amălinei et al., 2007). L'azione inibente svolta dai TIMPs si esprime con la formazione di un legame stechiometrico non covalente con le MMPs, in rapporto di 1:1 (Gomez et al., 1997). I TIMPs posseggono un dominio N-terminale ed uno C-terminale, rispettivamente di 125 e 65 AA, ciascuno dei quali contiene tre residui di cisteina che formano tra loro altrettanti ponti disolfuro (Amălinei et al., 2007). Nella loro conformazione quaternaria tali molecole assumono un aspetto a cuneo, in modo tale da inserirsi nel sito catalitico delle MMPs, in maniera analoga a come farebbe il corrispettivo substrato (Amălinei et al., 2007). L'azione inibente del TIMP-1 fu scoperta negli anni '70 (Welgus et al., 1979). Da allora molecole ortologhe ai TIMPs sono state identificate in un gran numero di organismi viventi, dai molluschi agli insetti

(Brew et al., 2000), a dimostrazione del fatto che tali proteine appartengono ad una ancestrale classe di molecole che si è ben conservata nel tempo (Stetler-Stevenson, 2008). Nell'uomo e negli altri mammiferi sono state identificate quattro diverse varianti di TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) (Brew and Nagase H, 2010). Tali molecole sono potenzialmente in grado di inibire tutte le MMPs attive, ma *in vivo* manifestano delle specifiche affinità (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). In particolare TIMP-1 manifesta affinità nei confronti della MMP-9, e, in misura inferiore, di MMP-1, MMP-3 e MMP-7 (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). TIMP-2 inibisce selettivamente la MMP-2, mentre TIMP-3 agisce su MMP-9 e MMP-2 sebbene con un'affinità inferiore rispetto a quella di TIMP-1 e TIMP-2 (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). Infine TIMP-4 inibisce l'attività catalitica delle MT-MMPs e di MMP-2 (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). TIMP-2 si configura come un membro unico e particolare della famiglia degli inibitori endogeni delle metalloproteinasi (Stetler-Stevenson, 2008). Tale molecola svolge una duplice funzione, in quanto pur agendo da inibitore della MMP-2, la sua presenza è richiesta per l'attivazione dello zimogeno pro-MMP-2 in enzima funzionalmente attivo (Stetler-Stevenson, 1999). Inoltre, TIMP-2 mostra una differente struttura genica rispetto agli altri TIMPs, ciascuno dei quali appare correlato ai geni codificanti per la sinapsina (Derry and Barnard, 1992; Pohar et al., 1999). In particolare TIMP-1, TIMP-3 e TIMP-4 risultano geneticamente collegati rispettivamente a sinapsina-1, sinapsina-3 e sinapsina-2 (Stetler-Stevenson, 2008). Tale correlazione genica appare filogeneticamente conservata nei vertebrati così come negli invertebrati,

sebbene il suo significato biologico sia ancora da chiarire (Stetler-Stevenson, 2008). Il gene codificante per TIMP-2 risulta invece correlato al gene DDC8 (Caterina et al., 2000; Jaworski et al., 2007). Sperimentalmente sono state osservate evidenze di *splicing* alternativo tra le due sequenze (Jaworski et al., 2007; Wang et al., 2000), sebbene anche in questo caso non sia ancora stato chiarito il significato di tale correlazione.

L'attività inibente svolta dai TIMPs nei confronti delle MMPs è stata ampiamente indagata, sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010); nell'ultimo decennio, tuttavia, il potenziale biologico di tali molecole è stato riconsiderato con una prospettiva più ampia, dal momento che numerosi studi hanno dimostrato l'esistenza di molteplici funzioni svolte dai TIMPs non sempre correlate all'attività inibente nei confronti delle MMPs (Ries, 2014). In particolare TIMP-1 è in grado di stimolare la proliferazione cellulare di cheratinociti, fibroblasti, condrociti, cellule epiteliali, cellule neoplastiche mammarie e di diverse linee cellulari leucemiche (Bertaux et al., 1991; Hayakawa et al., 1992; Saika et al., 1998). Inoltre il sequenziamento del cDNA di TIMP-1 ha permesso di osservare un'omologia pressoché totale con la sequenza della proteina EPA (*erythroid potentiating activity*), la quale promuove la proliferazione e la crescita dei precursori eritroidi (Gasson et al., 1985). Tale attività stimolatrice della crescita cellulare è svolta da TIMP-1 in maniera indipendente dall'azione di inibizione delle metalloproteinasi, sebbene la molecola debba trovarsi in forma libera, non legata cioè alla pro-MMP o alla MMP attiva (Hayakawa et al., 1992). Oggi è stato dimostrato che anche TIMP-2

agisce da mitogeno, stimolando la proliferazione cellulare (Stetler Stevenson et al., 1992; Hayakawa et al., 1994; Saika et al., 1998). Le due molecole, TIMP-1 e TIMP-2, agiscono su specifici recettori della membrana cellulare, solo recentemente identificati (Brew and Nagase H, 2010) e, attraverso differenti vie di trasduzione del segnale, attivano la proteina G Ras (Ries, 2014). Oltre che da mitogeno, TIMP-1 agisce anche da regolatore e inibitore della proliferazione cellulare, come dimostra uno studio condotto su topi TIMP-1 *knockout*; in questo studio fu osservato l'arresto nella proliferazione delle cellule epiteliali mammarie quando ai topi veniva somministrato un analogo sintetico del TMP-1, di cui erano stati geneticamente privati (Fata et al., 1999). Per TIMP-1 è stato anche dimostrato il ruolo antiapoptotico (Guedez et al., 1998), non riconosciuto per nessun altro membro della famiglia degli inibitori delle MMPs (Ries, 2014). Al contrario TIMP-3, contemporaneamente all'attività inibente le MMPs, interagisce con le componenti della MEC e promuove la morte cellulare Fas-dipendente in diversi tipi di cellule (Baker et al., 1998; Ahonen et al., 2003). È stato inoltre dimostrato che gli inibitori endogeni delle MMPs stimolano la differenziazione cellulare; in particolare TIMP-1 agisce sulle cellule eritroleucemiche (Murate et al., 1993), sulle cellule B normali e neoplastiche (Stetler-Stevenson et al., 1997; Guedez et al., 1998) e sulle cellule mesenchimali staminali (Pittenger et al., 1999). TIMP-2 promuove la differenziazione neuronale (Perez-Martinez and Jaworski, 2005; Jaworski and Perez-Martinez , 2006), mentre TIMP-3 influisce sulla proliferazione, differenziazione e mobilizzazione delle cellule ematopoietiche (Bernot et al., 2010). Infine, gli antagonisti delle

MMPs, in particolare TIMP-1, agiscono da inibitori dell'angiogenesi (Ries, 2014). Ciò non stupisce se si considera tale proprietà biologica in relazione alla loro funzione principale di inibizione dell'attività delle MMPs, le quali, degradando le componenti della MEC, facilitano la migrazione delle cellule endoteliali e la formazione di nuovi vasi sanguigni (Handsley and Edwards, 2005). Recenti studi tuttavia dimostrano che l'attività inibente la neoangiogenesi svolta dai TIMPs può verificarsi anche in maniera indipendente rispetto all'attività anti-proteasica (Akahane et al., 2004; Stetler-Stevenson and Seo, 2005).

Tutte queste proprietà biologiche recentemente identificate ed il riconoscimento di specifici recettori cellulari su cui tali molecole agiscono (Brew and Nagase H, 2010) rendono quella dei TIMPs una famiglia dalle ampie potenzialità, che merita di essere ulteriormente indagata per meglio comprenderne il ruolo svolto nei diversi processi patologici.

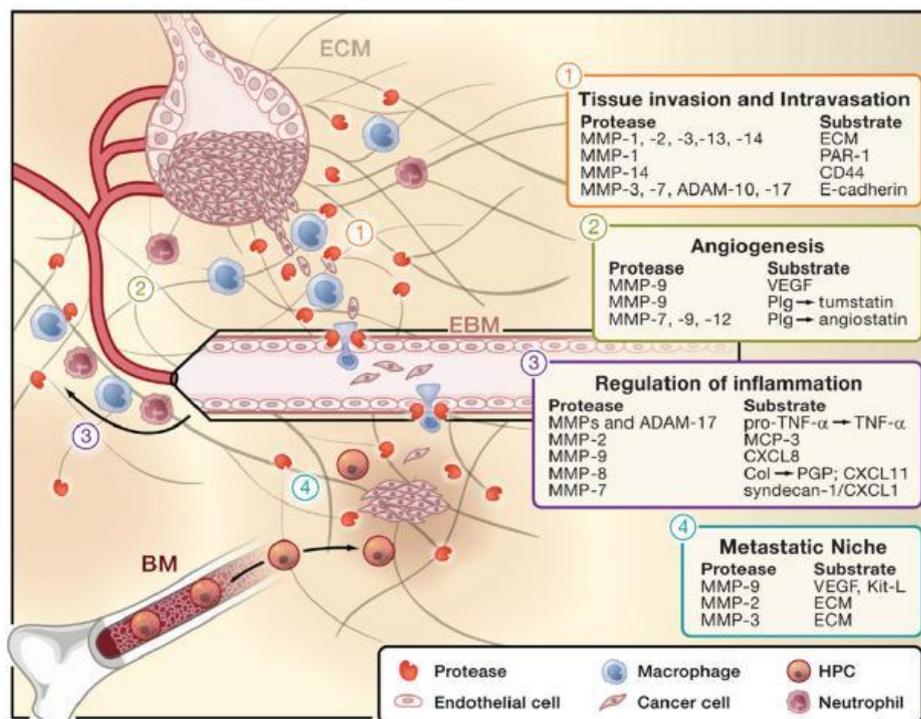
### **6.3. Ruolo di MMPs e TIMPs nella progressione neoplastica.**

Dal momento che le MMPs agiscono sulla MEC, modificandone la composizione, una variazione nella loro secrezione o del rapporto con i loro specifici inibitori può infine condurre all'alterazione dell'omeostasi tissutale e, di conseguenza, all'instaurarsi o aggravarsi di uno stato patologico (Moore and Crocker, 2012). Nel tempo le modificazioni dell'espressione delle MMPs sono state associate a una varietà di condizioni patologiche, nell'uomo così come negli animali domestici. In particolare, nel cane è stato riportato un consistente aumento delle

concentrazioni di MMP-2 e MMP-9 nel liquido sinoviale di soggetti affetti da artrite reumatoide (Coughlan et al., 1998) e della MMP-2 in corso di osteoartrite (Coughlan et al., 1995), mentre un incremento dell'espressione di MMP-9 è documentata nel miocardio di cani affetti da cardiomiopatia dilatativa (Gilbert et al., 1997). Inoltre, l'attività gelatinasica è risultata particolarmente elevata nell'essudato oculare di cani affetti da cheratocongiuntivite (Arıcan and Ceylan, 1999). Anche nell'encefalite demielinizzante del cane indotta dal virus del Cimurro è stata riscontrata una completa *up-regulation* delle MMPs e dei TIMPs, strettamente correlata alla fase di demielinizzazione (Miao et al., 2003). Nelle lesioni precoci di questa malattia, infatti, la maggior parte delle metalloproteinasi e degli inibitori viene sovraespressa, suggerendo così un ruolo importante giocato dalle MMPs in questa fase del processo; nelle lesioni più croniche, al contrario, l'espressione delle MMPs è fortemente ridotta, eccetto che per la MMP-11, MMP-12, MMP-13, così come tende a ridursi e a scomparire di pari passo l'espressione dei TIMPs (Miao et al., 2003). Questi risultati sembrano pertanto sostenere l'ipotesi secondo cui il motore per la progressione del Cimurro e delle lesioni encefaliche da questo provocate sia rappresentato da uno squilibrio tra l'espressione delle MMPs e dei TIMPs (Miao et al., 2003).

Tra tutte le possibili condizioni patologiche che affliggono uomini e animali domestici, la patologia neoplastica rappresenta il fulcro della ricerca scientifica degli ultimi 30 anni. Indagando i diversi meccanismi molecolari responsabili dell'insorgenza e progressione delle neoplasie, è apparso da subito interessante il potenziale ruolo svolto dalle MMPs, quali molecole in grado di modificare la

MEC creando un microambiente favorevole alle cellule tumorali e, in particolare, alla loro diffusione (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). Nel tempo sono state identificate diverse modalità con cui tale classe di molecole partecipa alla progressione neoplastica (Fig. 2). In primo luogo, come già sottolineato, le MMPs, degradando le diverse componenti della MEC, ne determinano il rimodellamento facilitando conseguentemente il distacco delle cellule neoplastiche (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). A tale principale proprietà biologica delle MMPs si aggiunge la capacità di degradare altri specifici target rappresentati da molecole che mediano l'adesione intercellulare, quali la E-caderina ed alcuni membri della famiglia delle integrine, facilitando ulteriormente la mobilitazione delle cellule tumorali (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). Inoltre è stato dimostrato che alcuni meccanismi molecolari che si verificano nel corso della trasformazione neoplastica di un tessuto, quali *epithelial to mesenchymal transition* (EMT) e la neoangiogenesi, sono in grado di promuovere la trascrizione e l'espressione dei geni codificanti per le MMPs, utili per la progressione della neoplasia stessa (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). Pertanto, è giustificato pensare che l'aumentata attività delle MMPs, sia essa dovuta ad una maggiore secrezione da parte delle cellule neoplastiche o alla concomitante riduzione dell'attività inibitoria svolta dai TIMPs, sia alla base dei processi di infiltrazione e metastatizzazione responsabili della progressione delle neoplasie (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010).



**Figura 2.** Funzioni svolte dalle MMPs nel microambiente tumorale.

Nell'uomo elevate concentrazioni di MMPs e delle gelatinasi in particolare, sono state riscontrate in numerose neoplasie associate a prognosi infausta per la spiccata tendenza dimostrata rispetto a invasione e metastatizzazione, quali il carcinoma polmonare (Kawano et al., 1997), carcinoma mammario (Dalberg et al., 2000), carcinoma gastrico (Yoshikawa et al., 2000), carcinoma del colon (Ogura et al., 1997) e prostatico (Stearns and Stearns, 1996), carcinomi squamosi orali (Kawamata et al., 1998) ed esofagei (Grobleska et al., 2012), il neuroblastoma (Sugiura et al., 1998), i tumori ovarici (Garzetti et al., 1999), il melanoma (Walker and Woolley, 1999) e il condrosarcoma (Sakamoto et al., 1999).

Tuttavia, attualmente in oncologia veterinaria non vi è ancora totale accordo circa il ruolo svolto dalle MMPs nella progressione neoplastica. In uno studio del 2003, l'analisi dell'espressione delle gelatinasi in un numero consistente di neoplasie di cane ha permesso di osservare una loro maggiore espressione nelle neoplasie maligne rispetto a quelle benigne, ed, in generale, nel tessuto neoplastico rispetto al tessuto di origine (Loukopoulos et al., 2003). In tale studio è risultato che la maggior parte delle neoplasie esprimeva pro-MMP-9, pro-MMP-2 e la forma attiva della MMP-2, mentre la forma attiva della MMP-9 veniva espressa solo nel fibrosarcoma non metastatico e nell'adenoma epatocellulare, lasciando supporre per tale gelatinasi un ruolo di scarsa rilevanza nel comportamento biologico delle neoplasie del cane (Loukopoulos et al., 2003). Nel medesimo studio è stata osservata una maggiore espressione delle gelatinasi nei tumori cartilaginei delle ossa, quali l'osteosarcoma condroblastico, il condrosarcoma e i tumori multilobulari dell'osso, rispetto ai tumori maligni non sarcomatosi, ai tumori benigni e a campioni non neoplastici, comprendenti tessuti normali, lesioni di altra natura e tessuti periferici al tumore (Loukopoulos et al., 2003). Inoltre, la produzione delle gelatinasi è risultata significativamente superiore nei tumori cartilaginei anche rispetto agli osteosarcomi e ai fibrosarcomi, nonostante l'osteosarcoma del cane venga considerato molto più aggressivo nel suo comportamento biologico rispetto al condrosarcoma e all'osteosarcoma condroblastico (Loukopoulos et al., 2003). Pertanto, l'elevata attività gelatinasica dimostrata nei condrociti, nei condroblasti maligni e nelle aree di produzione di matrice condroide, non sarebbe esclusivamente associabile

alla malignità, ma potrebbe essere in parte attribuita a un più rapido turnover della matrice, al rimodellamento tissutale e all'ossificazione cui comunemente si assiste nei tumori cartilaginei (Loukopoulos et al., 2003). Inoltre, in questo studio, grazie all'applicazione di metodiche di immunoistochimica e di zimografia, è stata dimostrata una più spiccata tendenza alla produzione di MMPs nelle cellule neoplastiche poste in posizione periferica rispetto a quelle collocate al centro del tumore, in accordo la capacità di tal enzimi di degradare la MEC e con il loro ruolo da essi svolto nel processo di invasione tumorale (Loukopoulos et al., 2003).

Nei tumori della ghiandola mammaria del cane è stato dimostrato che l'attività gelatinolitica delle forme attive di MMP-2 e MMP-9 è nettamente più marcata nei carcinomi rispetto agli adenomi (Kawai et al., 2006). Inoltre, recenti evidenze indicano un potenziale ruolo della riduzione dell'espressione di TIMP-2 nella trasformazione maligna della ghiandola mammaria del cane (Aresu et al., 2011).

Anche i tumori della cavità orale del cane, notoriamente rappresentati da neoplasie dalla spiccata tendenza alla metastatizzazione, come il melanoma, e da tumori localmente invasivi, quali il carcinoma squamoso, l'epulide acantomatosa e gli adenocarcinomi nasali, sono stati presi in considerazione per la valutazione dell'attività metalloproteasica (Nakaichi et al., 2007). In essi è stata dimostrata una chiara correlazione positiva tra l'espressione della MMP-2 e la tendenza alla metastatizzazione; inoltre, nel medesimo studio è stato osservato un elevato

rapporto MMP-2/TIMP-2 nelle neoplasie associate a prognosi più sfavorevole (Nakaichi et al., 2007).

Nel cane, inoltre, la MMP-2 risulta associata all'invasività dei mastocitomi (Leibman et al., 2000); più recentemente nei mastocitomi di alto grado è stato anche dimostrato uno squilibrio tra l'espressione di MMP-2 e MMP-9 e loro inibitori, a favore dell'attività gelatinasica (Giantin et al., 2012).

Quanto ai tumori vascolari, recentemente è stata esclusa la produzione di MMP-9 negli emangiomi come negli emangiosarcomi (Murakami et al., 2009). Al contrario, la MMP-2 è risultata maggiormente espressa nelle cellule neoplastiche maligne, con una positività di membrana e citoplasmatica (Murakami et al., 2009). Tale risultato può essere facilmente compreso se si considera quanto già noto circa il ruolo delle MMPs nell'angiogenesi. Il primo evento che caratterizza l'angiogenesi è la germinazione di cellule endoteliali, a partire da vasi sanguigni maturi, evento questo che richiede la degradazione sia della matrice extracellulare che della sottostante membrana basale, in particolare del collagene IV e della laminina, notoriamente substrati di elezione per le gelatinasi (Iivanainen et al., 2003). Nei tumori vascolari, la proliferazione maligna delle cellule endoteliali ricalca il modello dell'angiogenesi e necessita pertanto del contributo delle MMPs, in particolare della MMP-2 (Murakami et al., 2009).

Tutti questi esempi hanno nel tempo avvalorato il ruolo delle gelatinasi nella progressione neoplastica; mentre per la MMP-2 non mancano le evidenze scientifiche del loro coinvolgimento nell'invasività mostrata da differenti

neoplasie, il ruolo della MMP-9 risulta ancora poco chiaro. Quest'ultima, infatti, sebbene sia stata riscontrata in molti tessuti neoplastici, rivestirebbe un ruolo di minor importanza nel determinare la malignità dei tumori, vista la sua vasta espressione anche da parte di cellule non neoplastiche come i macrofagi e le cellule della muscolatura liscia vasale (Fujise et al., 2000).

#### **6.4. MMPs, TIMPs e meningioma**

Nell'uomo il meningioma rappresenta la più frequente neoplasia intracranica non gliale, con un'incidenza compresa tra il 13-19% (Von Randow et al., 2006). Le forme benigne sono più comuni di quelle maligne e generalmente la loro recidiva è legata ad una resezione chirurgica incompleta, mentre nei meningiomi atipici (grado II) e anaplastici (grado III) la recidiva resta un evento più frequente anche dopo completa resezione chirurgica (Maier et al., 1992; Palma et al., 1997; Schiffer et al., 2005). Questa differenza ha indotto la comunità scientifica a indagare i meccanismi molecolari alla base della progressione tumorale del meningioma, quali potenziali fattori prognostici per una più corretta gestione del paziente (Tews et al., 2001; Cuevas et al., 2005; Liu et al., 2005; Lusi et al., 2005; Lusi et al., 2005; Mawrin et al., 2005; Kalala et al., 2005). Un punto critico nella progressiva crescita tumorale che potenzia il rischio di recidiva è rappresentato dall'invasione e dall'infiltrazione delle cellule neoplastiche nel tessuto sano adiacente, peculiarità che appartiene prevalentemente ai meningiomi atipici (grado II) e anaplastici (grado III) (Von Randow et al., 2006). Dalle più recenti

acquisizioni scientifiche emerge che nel meningioma dell'uomo, sia esso benigno o maligno, una tappa fondamentale nella infiltrazione del tessuto adiacente da parte delle cellule neoplastiche è rappresentata dalla degradazione delle proteine di matrice extracellulare (Tews et al., 2001), evento di cui sono protagoniste le MMPs (Chang and Werb, 2001).

Nel tempo, diversi studi hanno indagato nel meningioma l'espressione delle MMPs, con particolare riferimento alle gelatinasi, ottenendo risultati contrastanti rispetto agli istotipi e gradi istologici che il tumore esprime, ma anche in relazione ai più comuni fattori prognostici. Tuttavia, mediante indagini d'immunoistochimica, è stato dimostrato che le meningi normali non esprimono MMPs ma acquistano tale capacità negli stati patologici del tessuto, siano essi infiammatori o neoplastici (Kieseier et al., 1998; Leppert et al., 2000).

I primi studi circa l'espressione delle MMPs nel meningioma dell'uomo risalgono agli anni '90. In uno studio del 1994 Nakagawa e colleghi indagarono in una serie di neoplasie intracraniche l'attività gelatinolitica e l'espressione di MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e TIMP-1. Tra i diversi tumori esaminati i meningiomi rappresentarono quelli a maggiore espressione di MMP-9. Inoltre, i meningiomi mostrarono una minore attività proteasica in rapporto ad una maggiore immunoreattività per TIMP-1, rispetto ad altre neoplasie intracraniche notoriamente più aggressive, quali astrocitomi e glioblastomi (Nakagawa et al., 1994). Tali risultati sono stati confermati in uno studio analogo in cui il meningioma mostrò una maggiore immunoreattività nei confronti di TIMP-1 e

TIMP-2 rispetto ad altri tumori intracranici più invasivi; in questo studio, tuttavia, la MMP-2 anziché la MMP-9 è risultata maggiormente espressa nelle neoplasie meningeo (Kachra et al., 1999). L'espressione della MMP-2 nel meningioma è stata tuttavia messa in dubbio l'anno successivo, e attribuita specificamente a neoplasie intracraniche più aggressive, associate ad una prognosi sfavorevole (Jäälinojä et al., 2000).

Studi che si sono nel tempo succeduti hanno approfondito l'espressione delle gelatinasi nei meningiomi, utilizzando metodiche che andavano dall'immunoistochimica alla zimografia, producendo risultati contraddittori rispetto ai precedenti. A pochi anni di distanza, infatti, il ruolo di MMP-2 e MMP-9 è stato considerato da marginale (Kirches et al., 2001) ad essenziale nella progressione neoplastica del meningioma (Siddique et al., 2003).

Più recentemente l'espressione delle MMPs è stata correlata al grado istologico del tumore, che nell'uomo ha un comprovato valore predittivo del comportamento biologico (Louis et al., 2007). Secondo alcuni autori vi sarebbe un aumento statisticamente significativo di cellule tumorali positive per la MMP-2 nei meningiomi di grado II rispetto ai meningiomi di grado I, e nei meningiomi di grado III rispetto ai meningiomi di grado II (Von Randow et al., 2006). La MMP-9, al contrario, sembra mostrare un'espressione maggiore nei meningiomi di grado II rispetto ai meningiomi WHO I, tornando a ridursi nei meningiomi di grado III (Von Randow et al., 2006). Più recentemente, solo per la MMP-9 è stato dimostrato un aumento di concentrazione al crescere del grado del tumore

(Panagopoulos et al., 2008; Barresi et al., 2011). Se da una parte, tuttavia, indagini di *western blot* non hanno rilevato differenze significative nell'espressione delle gelatinasi nei meningiomi benigni e atipici (Mizoue et al., 1999), immunohistochimica e biologia molecolare continuano a confermare una maggiore espressione di MMP-2 e MMP-9 nei meningiomi atipici e anaplastici (Okada et al., 2004). Anche nel meningioma di cane l'espressione di MMP-2 e MMP-9 è stata indagata in relazione alla malignità istologica, senza tuttavia mostrare differenze significative tra neoplasie benigne e maligne (Mandara et al., 2009).

Quanto all'espressione di MMPs nelle diverse varianti istologiche del meningioma, su colture cellulari ottenute da meningioma di uomo è stata osservata una espressione di MMPs bassa, in caso di meningioma meningoteliale, intermedia per il meningioma transizionale ed elevata per il meningioma fibroblastico (Rooprai et al., 2003). Tale risultato è stato recentemente confermato in uno studio in vivo, in cui il meningioma fibroblastico, insieme con la variante transizionale e cordoide e con i meningiomi atipici, è risultato tra gli istotipi che maggiormente esprimono le gelatinasi (Barresi et al., 2011). Nel medesimo studio i meningiomi microcistici sono risultati negativi per entrambe le metalloproteinasi, confutando l'ipotesi avanzata qualche anno prima circa un possibile ruolo svolto da variazioni del rapporto MMPs/TIMPs nella formazione delle cavità microcistiche, caratteristiche di tale variante istologica (Paek et al., 2006). Nel cane non sono

riportate evidenze di variazioni dell'espressione delle gelatinasi in rapporto all'istotipo della neoplasia (Mandara et al., 2009).

La capacità delle neoplasie meningiali di esprimere proteasi in grado di facilitare la diffusione delle cellule tumorali è stata anche indagata in relazione ai più comuni fattori prognostici del meningioma. In particolare, nell'uomo l'espressione della MMP-9 sembra essere correlata positivamente con l'indice di replicazione delle cellule neoplastiche (Okada et al., 2004; Von Randow et al., 2006; Panagopoulos et al., 2008; Barresi et al., 2011) e con il grado di invasione del parenchima cerebrale adiacente (Nordqvist et al., 2001). Inoltre, nelle linee cellulari ottenute da meningioma umano e ingegnerizzate al fine di ottenere il silenziamento del gene della MMP-9, è stata dimostrata un'evidente riduzione del potenziale proliferativo del tumore (Tummalapalli et al., 2007). In uno studio del 2004, Okada e colleghi indagarono l'impatto prognostico dell'espressione di MMP-2 e MMP-9 sulla valutazione del rischio di recidiva post-operatorio, partendo dal presupposto che le collagenasi contribuiscono all'infiltrazione della dura madre e dell'aracnoide (Okada et al., 2004). In particolare, l'infiltrazione di quest'ultima viene considerata condizione implicata nel determinismo della recidiva della neoplasia (Okada et al., 2004). Gli autori, supportati da uno studio statistico, dimostrarono che la ricomparsa della neoplasia era più frequente nei meningiomi che esprimevano alti livelli di gelatinasi (Okada et al., 2004).

Quanto al meningioma di cane, non è stata identificata alcuna correlazione tra il livello di espressione delle gelatinasi e il potenziale proliferativo delle neoplasie (Mandara et al., 2009).

Come già sottolineato la malignità biologica del meningioma risiede in gran parte negli effetti secondari che il tumore produce sul tessuto nervoso circostante. Tra questi, uno dei più temuti è l'edema perilesionale, condizione che si riscontra nel 60% dei meningiomi umani (Bitzer et al., 1997; Bitzer et al., 1997; Tamiya et al., 2001). L'edema contribuisce all'aumento della pressione intracranica e all'effetto massa del tumore, aumentando la morbilità e mortalità legate a questa patologia neoplastica (Foster et al., 1988; Bitzer et al., 1997; Bitzer et al., 1997; Tamiya et al., 2001; Snyder et al., 2006). Fino ad oggi nel meningioma dell'uomo sono state riconosciute diverse condizioni associabili alla formazione dell'edema peritumorale, quali la dimensione del tumore (Bitzer et al., 1997; Bitzer et al., 1997; Tamiya et al., 2001), la localizzazione (Lobato et al., 1996; Bitzer et al., 1997), l'istotipo (Philippon et al., 1984; Alvarez et al., 1987; Maiuri et al., 1987; Constantini et al., 1993; De Vries and Wakhloo, 1993; Lobato et al., 1996; Tamiya et al., 2001), la densità vascolare (Yoshioka et al., 1999), l'apporto di sangue alla pia madre (Bitzer et al., 1997; Yoshioka et al., 1999; Tamiya et al., 2001; Pistolesi et al., 2002), l'ostacolo al deflusso venoso indotto dalla neoplasia (Bitzer et al., 1998), l'espressione del VEGF (Kalkanis et al., 1996; Goldman et al., 1997; Provias et al., 1997; Bitzer et al., 1998; Yoshioka et al., 1999; Pistolesi et al., 2002) e del suo recettore (Otsuka et al., 2004). È ormai noto che il principale evento alla base della formazione dell'edema perilesionale nel SNC è la distruzione della barriera

emato-encefalica con fuoriuscita del siero nello spazio extracellulare, noto come meccanismo vasogenico (Webb and Muir, 2000; Sandoval and Witt, 2008). Partendo dal presupposto che le gelatinasi sono in grado di degradare il collagene di tipo IV, componente essenziale della membrana basale, la loro espressione è stata indagata via via indagata nel meningioma dell'uomo in relazione all'edema perilesionale (Nordqvist et al., 2001; Paek et al., 2002; Paek et al., 2006), arrivando a dimostrare che tale correlazione esiste con l'espressione della MMP-9 ma non con quella della MMP-2 (Nordqvist et al., 2001). Il ruolo della MMP-9 nel determinismo dell'edema perilesionale è stato recentemente confermato anche nei meningiomi benigni sopratentoriali (Iwado et al., 2012).

L'edema perilesionale è una condizione di frequente riscontro anche nel meningioma di cane, e si rende spesso responsabile dell'aggravarsi del quadro clinico dei soggetti affetti da tale neoplasia intracranica (Thomas et al., 1996; Kraft et al., 1997; Sturges et al., 2008). In un recente studio l'espressione di MMP-2 e MMP-9 è stata messa in relazione con l'edema perilesionale in una serie di meningiomi rostrotentoriali di grado I. Tuttavia, i risultati non hanno confermato la presenza di alcuna correlazione causale (Beltran et al., 2013).

L'espressione delle metalloproteinasi è stata indagata anche in relazione alle capacità del meningioma di infiltrare la dura madre e di produrre osteolisi nel tessuto osseo adiacente. Nel primo caso è stato osservato che solo la MMP-1 viene intensamente espressa nella punto di impianto della dura madre adiacente

al tumore, oltre che nelle cellule tumorali protagoniste dell'infiltrazione (Nagashima et al., 2006). Nel secondo caso, un'elevata espressione di MMP-2 è stata documentata in aree di osteolisi prodotta dal tumore nel tessuto osseo adiacente. Tuttavia, l'osteolisi del calvarium non viene considerata un indice di malignità e di prognosi sfavorevole, dal momento che è evento comune anche in associazione allo sviluppo di meningiomi benigni (Moon et al., 2010).

Tra le diverse alterazioni del tessuto osseo che si riscontrano in corso di meningioma l'iperostosi del cranio viene considerata uno degli aspetti più tipici del meningioma intracranico dell'uomo (Pei et al., 2012). Diverse teorie sono state proposte per spiegare la patogenesi di tale alterazione ossea in corso di meningioma; attualmente, si ritiene che l'iperostosi sia un effetto che consegue all'invasione del tessuto osseo da parte delle cellule neoplastiche (Pei et al., 2012). In questo contesto, l'espressione delle MMPs da parte delle cellule tumorali potrebbe modificare il microambiente del tessuto osseo inducendo un'alterazione del suo metabolismo, con successiva eccessiva deposizione di matrice ossea (Pei et al., 2012). A conferma ulteriore della MMP-2 nel determinismo di questa lesione ossea è l'osservazione secondo cui l'espressione di MMP-2 è maggiore nelle cellule neoplastiche prossime alle lesioni iperostotiche rispetto alla restante porzione del tumore, (Pei et al., 2012). Vale la pena ricordare, tuttavia, che l'iperostosi si riscontra occasionalmente nel meningioma di gatto (Troxel et al., 2004) mentre nel cane viene considerato un evento aneddótico associato allo sviluppo di meningioma intracranico (Mercier et al., 2007).

## **7. Parte sperimentale**

### **7.1. Materiali e metodi**

#### **7.1.1. Selezione dei casi oggetto di studio**

Per questo studio sono stati selezionati 54 casi di meningioma di cane; i campioni scelti erano rappresentati da tessuto neoplastico fissato in formalina neutra tamponata al 10% e successivamente incluso in paraffina per l'esame istopatologico, e così conservati presso l'archivio del Laboratorio di Neuropatologia del Reparto di Diagnostica di Laboratorio. I criteri di selezione dei casi comprendevano la diagnosi istopatologica di meningioma, cerebrale o spinale, e la provenienza dei campioni da strutture veterinarie dotate del Servizio di Neurologia e pertanto in grado di fornirci informazioni anamnestiche e dati di *follow up* dei soggetti inseriti nello studio. Nella maggior parte dei casi (38 su 54) la raccolta dei campioni è stata effettuata in sede intraoperatoria, mentre nei restanti casi si trattava di campioni necroscopici. Nella Tabella 1 vengono indicati il tipo di prelievo, bioptico o necroscopico, e la localizzazione del tumore, cerebrale o spinale.

Sono stati inoltre selezionati 4 casi controllo, rappresentati da NAT (*normal adjacent tissue*), con cui comparare i risultati del nostro studio.

**Tabella 1.** Tipologia di prelievo e sede della lesione dei casi selezionati.

<b>N. Archivio</b>	<b>Codice</b>	<b>Tipo di prelievo</b>	<b>Sede della lesione</b>
2012-2850	1	N	E
2012-2687	2	B	M
2012-2434	3	N	E
2012-2430	4	N	E
2012-1499	5	B	E
2012-1498	6	N	E
2012-1421	7	B	E
2012-1264	8	N	E
2012-1142	9	B	E
2012-731	10	B	M
2012-530	11	N	E
2012-517	12	B	E
2012-495	13	B	E
2012-34	14	B	M
2011-3204	15	B	E
2011-2804	16	B	M
2011-2423	17	B	M
2011-1559	18	N	E
2011-1077	19	B	E
2011-855	20	N	E
2011-713	21	B	E
2011-393	22	B	E
2010-2095	23	B	E
2013-3870	24	B	E
2010-1092	25	B	M
2013-1836	26	B	E
2009-2757	27	B	E
2009-2669	28	B	E
2009-2613	29	B	E
2013-1530	30	B	E
2013-2335	31	B	M
2013-2336	32	N	M
2013-375	33	N	E
2013-1242	34	B	E
2011-2483	35	N	E
2011-2477	36	N	E
2011-2235	37	B	E
2013-3331	38	B	E
2009-2040	39	B	M
2013-2675	40	B	E
2013-2639	41	B	E

2009-913	42	B	M
2009-662	43	B	E
2009-627	44	B	M
2009-274	45	B	E
2008-2765	46	B	E
2008-2589	47	N	M
2008-1954	48	B	M
2008-1515	49	N	E
2008-1180	50	B	M
2012-1270	51	N	E
2013-1695	52	N	E
2010-1859	53	B	M
2010-2473	54	B	E

(B) = biotico; (N) = necroscopico; (E) = encefalo; (M) = midollo spinale.

### 7.1.2. Indagini istopatologiche

Da ciascun campione sono state ottenute sezioni di 5 µm da sottoporre ad una routinaria colorazione con Ematossilina-Eosina. Successivamente tutti i tumori selezionati sono stati attentamente riesaminati al microscopio ottico, e, sulla base dei criteri correnti stabiliti nell'*Human International WHO Histological Classification System* (Louis et al., 2007), è stato attribuito loro il grado istologico, secondo quanto già riportato nel cane (Mandara et al., 2009). A tal fine i criteri istopatologici presi in considerazione sono stati i seguenti:

- Grado I: bassa attività mitotica (< 4 mitosi /10 HPF).
- Grado II: uno dei seguenti criteri,
  1. attività mitotica ≥ 4 mitosi /10HPF;
  2. presenza di invasione del parenchima cerebrale;

3. fino a tre dei seguenti caratteri istologici: pattern di crescita solida; elevata cellularità; elevato rapporto nucleo-citoplasma; macronucleoli; foci di necrosi spontanea.
- Grado III: elevato indice mitotico (< 20mitosi/HPF) associato ad evidente anaplasia cellulare.

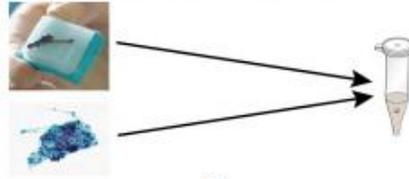
### **7.1.3. Estrazione dell'acido nucleico (RNA)**

Per le indagini di biologia molecolare è stato estratto l'RNA da materiale incluso in paraffina, utilizzando *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Ambion, Life Technologies). In primo luogo per ciascun campione sono stati selezionati i blocchetti di paraffina più rappresentativi e adatti all'estrazione dell'acido nucleico, ovvero contenenti la maggiore quantità di tessuto neoplastico e caratterizzati da minima contaminazione ematica. Da ciascun blocchetto di paraffina sono state ottenute 6 sezioni di 10 µm di spessore, immediatamente raccolte in provette Eppendorf sterili di 1,5 mL. Durante questa fase, particolare attenzione è stata posta al fine di evitare contaminazioni tra i vari campioni. A questo scopo le sezioni sono state ottenute previa disinfezione del microtomo, la lama è sempre stata sostituita e disinfettata tra un campione e l'altro, e la porzione superficiale del blocchetto di paraffina è stata sempre rimossa ed eliminata. Le sezioni così ottenute sono state incubate con xilene ad alte temperature, al fine di solubilizzare e rimuovere la paraffina dal tessuto, e successivamente lavate con soluzione alcolica. Mediante centrifugazione è stata

ottenuta la separazione del pellet dal surnatante, che è stato rapidamente e delicatamente eliminato, lasciando poi asciugare i campioni a temperatura ambiente al fine di favorire la completa evaporazione della soluzione alcolica utilizzata. I campioni così sparaffinati sono stati poi sottoposti ad una fase di digestione proteasica, con lo scopo di degradare le proteine che legano in modo covalente gli acidi nucleici; per favorire la completa digestione delle proteine, l'azione enzimatica della proteasi è stata potenziata con il calore ponendo i campioni in termoblocco, fino ad una temperatura massima di 80°C. In questa fase è stata posta particolare attenzione al rispetto dei tempi e della temperatura massima d'incubazione indicata dal produttore per minimizzare il potenziale danno del calore sull'acido nucleico. Infine, l'RNA è stato purificato e catturato su specifici filtri in fibra di vetro, da cui è stato estratto con una serie di lavaggi ed eluizioni.

L'RNA così ottenuto è stato quindi posto in Eppendorf sterili da 200 µL e conservato a -20°C per l'utilizzazione in tempi brevi, o, in alternativa, a -80°C per la conservazione a lungo termine (Fig.3).

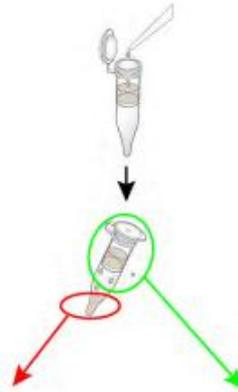
**Step 1: Deparaffinize FFPE tissue blocks (1a) or slide-mounted sections (1b)**  
Remove paraffin with xylene, remove excess xylene with ethanol, then dry samples



**Step 2: Digest the deparaffinized samples with Protease**  
Add Protease, incubate at 50°C for 16 hours or 65°C for 4 hours, then at 80°C for 15 minutes



**Step 3: Separate RNA from DNA on a Filter Cartridge**  
Add Isolation Additive, then apply the mixture to a Filter Cartridge



**Step 4: Recover the RNA from the flow-through**  
Apply the flow-through after ethanol addition to a Filter Cartridge, treat with DNase on the Filter Cartridge, then wash and elute the RNA



**Step 5: Recover the DNA from the Filter Cartridge**  
Treat DNA with RNase A on the Filter Cartridge, then wash and elute the DNA



**Figura 3.** Fasi dell'estrazione dell'RNA.

#### **7.1.4. Valutazione quantitativa e qualitativa dell'estratto mediante spettrofotometro**

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata misurando l'assorbanza del campione a 260 nm, mediante lo spettrofotometro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technology). Questo spettrofotometro uv/vis (ultravioletta/visibile) utilizza microvolumi di campione, fino a 1  $\mu$ L. Il NanoDrop ND-1000 permette quindi l'utilizzo di una quantità minima per la quantificazione del materiale, e inoltre non necessita dell'uso di cuvette o capillari né di particolari diluizioni del campione stesso, permettendo di eseguire misure rapide e semplici. I campioni sono stati pipettati direttamente sul basamento di misura, lì dove la tensione superficiale viene utilizzata per mantenere sulla colonna il campione liquido durante la misurazione, eseguita in pochi secondi tramite due fibre ottiche. Lo spettro e la relativa analisi sono stati successivamente visualizzati tramite un apposito software, che ha anche consentito di valutare alcuni indicatori di purezza del campione, come i rapporti 260/280 e 260/230. Il primo è indice della contaminazione da parte delle proteine, molecole che assorbono radiazioni con lunghezza d'onda di 280 nm, mentre il secondo individua gli acidi nucleici che assorbono a 260 nm. Preparazioni pure di RNA hanno valori di A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> uguali 2. Per quanto riguarda l'assorbanza a 230 nm, cioè ai margini dello spettro di assorbimento degli acidi nucleici, essa riflette la contaminazione del campione dovuta a sostanze come carboidrati, fenoli, composti aromatici. Per campioni puri il rapporto A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> è di circa 2.2.

### 7.1.5. Retrotrascrizione dell'estratto

In seguito all'estrazione, l'RNA è stato retrotrascritto in DNA complementare (cDNA) per poter poi procedere con l'indagine di PCR. La retrotrascrizione è stata ottenuta mediante l'impiego dell'enzima trascrittasi inversa, una DNA polimerasi RNA dipendente; tale enzima può sintetizzare il DNA complementare ad una catena di RNA data, formando un doppio filamento ibrido RNA-DNA. L'enzima necessita di deossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs), una catena di circa 20 residui di timina (oligo dT), una soluzione tampone e  $Mg^{2+}$ . A tal fine è stato utilizzato un kit commerciale (iScript™ cDNA Synthesis Kit) che prevede l'utilizzo di una mix unica, contenente oligo dt e random primers, a cui aggiungere il campione. Attraverso l'uso di un termociclatore, i campioni sono stati sottoposti ad un programma regolato di tempi e temperature:

1. 5' a 25°C - fase di appaiamento (annealing), la catena oligo dT si lega alla coda di poli(A) dell'mRNA innescando la reazione;
2. 30' a 42°C - fase di allungamento, l'enzima sintetizza il nuovo filamento di cDNA aggiungendo un dNTP alla volta a partire dall'estremità 3'-OH libera dell'oligo dT appaiato;
3. 5' a 85°C - degradazione dell'RNA, rimane il filamento singolo di cDNA.

I campioni di cDNA sono stati conservati a -20°C fino alla successiva fase di lavoro, ovvero la real time PCR.

### 7.1.6. Progettazione dei Primer

Il successo di una reazione di PCR dipende dalla scelta corretta dei primer. I primer devono essere scelti in modo da essere ciascuno complementare al suo filamento stampo. La specificità del primer è determinata da:

- Lunghezza del primer

La lunghezza ottimale dei primer dipende sia dal suo contenuto in A+T, sufficientemente basso da poter avere una temperatura di melting (e quindi una temperatura di annealing) superiore a 50 °C, sia dalla composizione nucleotidica della loro sequenza. Tale lunghezza riduce la probabilità di avere siti di annealing diversi da quello voluto. Pertanto è la lunghezza del primer a determinare la specificità, la temperatura e il tempo di annealing. Essa è generalmente compresa tra 18 e 24 nucleotidi.

Per calcolare la probabilità di ritrovare in una sequenza di DNA un definito pattern di basi (aspecifico), è sufficiente moltiplicare la probabilità associata a ciascuna base ( $1/4$ ) per la lunghezza del motivo cercato, ossia  $\frac{1}{4} \times n$ , dove  $n$  = numero di basi. Di conseguenza un oligonucleotide con non meno di 17 basi sarà estremamente specifico ( $1/17.179.869.184$  la probabilità di legare una sequenza aspecifica) (Tab.2).

**Tabella 2.** Probabilità di trovare una base per sequenza di nucleotidi.

<b>N° Nucleotidi</b>	<b>Probabilità associata</b>
1	4
2	16
3	64
4	256
5	1024
6	4096
7	16.384
8	65.536
9	262.144
10	1.048.576
11	4.194.304
12	16.777.216
13	67.108.864
14	268.435.456
15	1.073.741.824
16	4.294.967.296
17	17.179.869.184

○ Temperatura di melting (Tm)

La Tm di un primer dipende dalla sua lunghezza e dalla composizione in basi.

Per calcolare la Tm dei primer di lunghezza inferiore a 20 basi, si usa la regola di Wallace (Tab.3):

$$Tm = 2 \text{ °C (A + T)} + 4 \text{ °C (G + C)}$$

La temperatura di annealing (Ta) di un esperimento di PCR si determina calcolando la Tm di ciascun primer e applicando una temperatura più bassa di 2-4°C. E' importante quindi che i due primer abbiano Tm simili, con uno scarto massimo di 2-3 °C.

**Tabella 3.** Temperatura di melting associata alla lunghezza del primer al 50% in guanina e citosina.

Lunghezza primer	Tm
4	12°C
8	24°C
12	36°C
14	42°C
16	48°C
18	54°C
20	60°C
22	66°C
24	72°C
28	84°C
32	96°C

○ Contenuto in guanina e citosina (GC)

Per assicurare specificità verso il target, il contenuto in GC deve essere intorno al 50% del numero delle basi che costituiscono il primer.

○ Assenza di dimeri o di altre strutture secondarie intramolecolari o intermolecolari

Questa condizione garantisce il risultato della PCR in qualità e resa. Le strutture secondarie, infatti, competono per l'annealing del primer con lo stampo sulla sequenza di DNA bersaglio, diminuendo drasticamente la concentrazione effettiva di primer disponibile per la reazione di amplificazione. Le strutture secondarie si possono classificare come "hairpin" (forcine), "self dimer" (autodimeri) e "cross dimer" (dimeri crociati). Gli "hairpin" si formano per l'interazione intramolecolare tra i nucleotidi del singolo primer: quelli al terminale 3' sono i meno tollerati in quanto

sequestrano direttamente il residuo ossidrilico necessario alla polimerizzazione. I “self dimer” si formano per l’interazione intermolecolare tra due molecole di primer dello stesso tipo, nei punti in cui il primer è omologo a se stesso, mentre i “cross dimer” si formano tra due molecole di primer di tipo diverso (senso, antisenso) nelle regioni di omologia di sequenza (Tab.4).

**Tabella 4.** Caratteristiche generali di un primer.

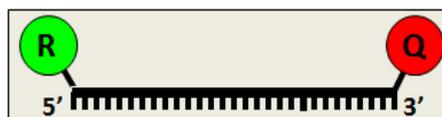
- Lunghezza di 18-20 basi
- Temperature di annealing senso ed antisenso simili (40-60°C)
- Contenuto in GC intorno al 40-60%
- Perfetta complementarietà con le sequenze della regione da amplificare
- Assenza di regioni di complementarietà interna fra primer (hairpin) 5’GAGATCGTTGCTTCGATCTC-3’
- Assenza di regioni di complementarietà fra primer (dimeri) 5’GATCGATCGATACGTGATCC-3’ 3’-GCACTAGGTCGCTATACGCTAT-5’
- Mancanza di ripetizioni di una stessa base all’interno del primer
- G o C all’estremità 3’ per rendere più stabile il legame del primer allo stampo.
- La concentrazione dei primer bilanciata rispetto a quella dello stampo

In questo studio i primers utilizzati per l’amplificazione sono stati progettati sulla base delle sequenze di riferimento pubblicate in banca dati (numeri di accesso GenBank: AF169244.2; AF177217.1 ; AF077817.1; AF112115.1 ; XM846843.1). Confrontando queste sequenze con le relative sequenze di DNA genomico è

stato possibile individuare la suddivisione esoni-introni. Per escludere la contaminazione da DNA genomico (gDNA), i primers sono stati dunque progettati in modo che si appaiassero su esoni differenti e non sul medesimo esone. Mediante il software BLASTN ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) è stata valutata la validità biologica, per escludere eventuali somiglianze tra la zona di sequenza del disegno primers con zone del genoma differenti da quella attesa.

#### 7.1.7. Progettazione delle sonde

Una sonda-primer non è altro che un semplice oligonucleotide, complementare alla sequenza target da amplificare, che presenta un singolo o doppio mismatch (1-2 basi non complementari) all'estremità 3', in modo che la sonda non si ibridizzi perfettamente al DNA bersaglio. Alle due estremità della sequenza oligonucleotidica sono presenti due particolari molecole detti fluorocromi.



All'estremità 5' è posto il reporter (R) o fluoroforo, un fluorocromo ad alta energia che emette fluorescenza, mentre all'estremità 3' si trova il quencher (Q), un fluorocromo a bassa energia che, quando si trova vicino a R ne spegne la fluorescenza assorbendone i fotoni.

Una volta che i primer si sono legati al filamento stampo, o templato, la DNA-polimerasi inizia a polimerizzare il filamento complementare. Raggiunto il *mismatch* presente all'estremità 3' della sonda, l'enzima, nel tentativo di riparare

l'errore, degrada la sonda, provocando in questo modo il rilascio di R e il suo allontanamento da Q, con conseguente emissione della fluorescenza (Fig.4).

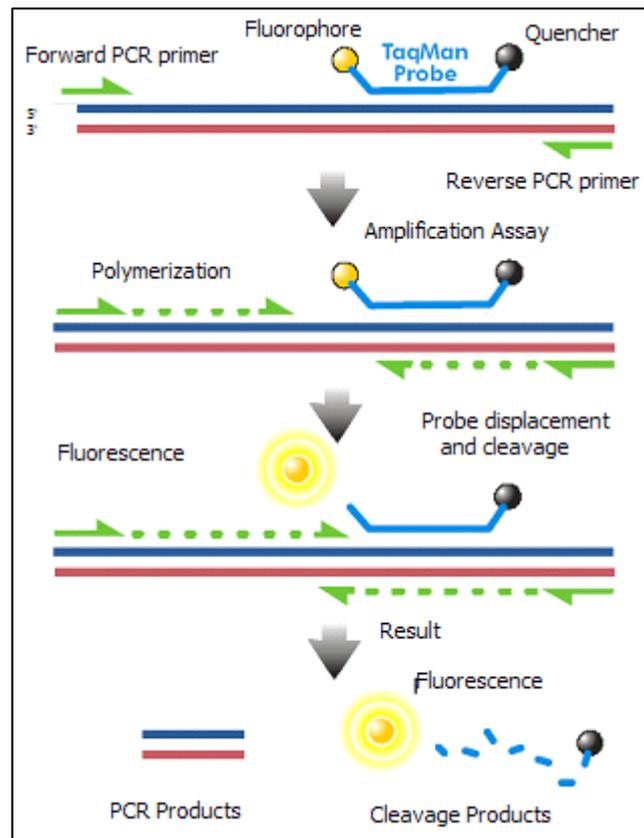


Figura 4. Modalità di azione delle sonde.

Nella progettazione della sonda è necessario valutare la posizione del fluoroforo e del quencher poiché, se troppo ravvicinati, si può osservare un'interferenza nell'emissione della fluorescenza.

In PCR le sonde si legano al DNA stampo durante la denaturazione termica e, in piccola parte, durante annealing. Durante la fase di raffreddamento (tra la denaturazione e l'annealing) i primer competono con le sonde perché, anche se la loro zona di elezione è differente, una volta che il primer si lega al filamento

stampo, esso viene immediatamente esteso, coprendo in questo modo la sequenza target della sonda. Inoltre, il legame del primer con il template è irreversibile, mentre le sonde si legano in modo reversibile. Per tali ragioni è importante che le sonde si leghino alla sequenza bersaglio con maggiore facilità rispetto ai primer. Per ottenere questa alta specificità, le sonde devono avere una temperatura di dissociazione (annealing) sensibilmente più alta dei primer (7-10 °C), ma non alta per permettere che le sonde possano essere spostate dal filamento in via di sintesi. Se ciò non accade, l'amplificazione viene ostacolata e la PCR fallisce. Indicativamente, la temperatura di dissociazione deve essere di 5°C al di sopra della temperatura di estensione o di "annealing", se queste coincidono. In linea di massima, le sonde di ibridazione possono legarsi in qualsiasi posto sulla sequenza bersaglio; tuttavia, si preferisce posizionare la sonda "tutta a destra" sul filamento superiore, o "tutta a sinistra" nella sequenza del filamento inferiore. Contrariamente a quanto accade per la progettazione dei primer, nel disegno delle sonde non si deve tenere conto di siti complementari al di fuori della regione amplificata. In genere è bene progettare le sonde in sequenze "bilanciate", ossia con una distribuzione equa delle quattro basi. Tratti di sequenza con un legame eccezionalmente forte vanno evitati, come in sequenze ricche di GC, dove è sufficiente una regione minima per formare un legame molto stabile. Inoltre, è importante evitare la complementarità tra il termine 3' dei primer e le sonde; questa condizione, infatti, può indurre la formazione di dimeri tra primer e sonda, in modo particolare all'inizio della

reazione quando non è ancora stato amplificato nessun frammento, portando a prodotti aspecifici in grado di generare segnali fluorescenti.

Le sonde utilizzate in questo studio sono riportate nella Tabella 5.

**Tabella 5.** Sonde utilizzate in questo studio.

<b>Gene</b>	<b>Name</b>	<b>GenBank</b>	<b>Exons connected</b>	<b>Amplicon</b>
<b>MMP9</b>	Matrix metalloproteinase 9	AF169244.2	2-3	81 bp
<b>MMP2</b>	Matrix metalloproteinase 2	AF177217.1	2-3	74 bp
<b>TIMP1</b>	Metalloproteinase inhibitor 1	AF077817.1	3-4	63 bp
<b>TIMP2</b>	Metalloproteinase inhibitor 2	AF112115.1	1-2	81 bp
<b>ACTB</b>	Actin beta	XM846843.1	1	73 bp

### 7.1.8. Real Time RT PCR

In questo studio la real-time PCR è stata allestita in un volume di reazione di 20  $\mu\text{L}$ , costituita da 10  $\mu\text{L}$  di iTaq Universal Probes Supermix (BioRad, Berkeley, CA, USA), 1  $\mu\text{L}$  di TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystem, Carlsbad CA, USA), il tutto portato ad un volume finale di 16  $\mu\text{L}$  con acqua distillata sterile. I reagenti sono stati miscelati e suddivisi in una piastra da real-time a 96 pozzetti. Successivamente, sono stati aggiunti 4  $\mu\text{L}$  di DNA, diluito 1:10, o di acqua (nei campioni bianchi di controllo). L'amplificazione del DNA è stata ottenuta utilizzando lo strumento iCycler iQ (BioRad, Berkeley, CA, USA), con i seguenti cicli:

- a. 95 °C  $\times$  10 min
- b. 45 cicli:
  - 95 °C  $\times$  15 sec
  - 61 °C  $\times$  60 sec

È stata quindi eseguita l'elettroforesi dei prodotti di PCR per verificare se gli ampliconi ottenuti presentavano la lunghezza di basi attesa dal disegno in silico dei primers. In particolare, i prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1,5 % in Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1 $\times$  con Etidio Bromuro (EtBr) alla concentrazione finale di 0,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Come marcatore è stato utilizzato "GeneRuler" (Fermentas, Hannover, Maryland, USA), che contiene frammenti di DNA di lunghezza definita che si separano durante la corsa; ciò permette di determinare la lunghezza del campione in base al confronto tra la posizione della

relativa banda e quelle del marcatore. La corsa è stata eseguita a voltaggio compreso tra 80 e 120V e, a fine corsa, il gel è stato osservato al transilluminatore UV.

Durante ciascun ciclo sono stati raccolti i valori di fluorescenza e i valori di Ct sono stati calcolati automaticamente per ciascuna PCR.

Tutti i saggi sono stati effettuati in triplo per ciascuna sonda e per ciascun campione, e la  $\beta$ -actina è stata scelta come gene normalizzatore (*housekeeping*) per normalizzare l'espressione dell'mRNA attraverso il metodo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Per normalizzare i campioni da quantificare con il metodo dei " $\Delta\Delta Ct$ ", si calcola la differenza tra il Ct del gene analita e il Ct del gene endogeno (*housekeeping*). I valori di  $\Delta Ct$  e le relative percentuali di analita (più precisamente il log della percentuale) costituiscono le coordinate (rispettivamente ordinata e ascissa) dei punti la cui retta interpolante costituisce la retta di calibrazione. Mediante la retta di calibrazione, dal valore di  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  di un campione incognito si risale alla relativa % di analita nella miscela. Il metodo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  di Livak presume che i geni analita e riferimento siano amplificati con efficienze prossime al 100%, e a non più del 5% l'una dall'altra. Prima di usare questo metodo, è essenziale verificare i presupposti determinando l'efficienza di amplificazione dei geni analita e riferimento. Una volta verificati i presupposti, si può determinare la differenza relativa nel livello dell'espressione del gene analita in differenti campioni, usando i seguenti passaggi. Innanzitutto dobbiamo normalizzare il CT del gene analita rispetto a quello del gene di riferimento, sia per il campione che per il calibratore:

$\Delta Ct$  (campione) = Ct (campione) - Ct (normalizzatore)

$\Delta Ct$  (calibratore) = Ct (calibratore) - Ct (normalizzatore)

$\Delta\Delta Ct$  =  $\Delta Ct$  (campione) -  $\Delta Ct$  (calibratore)

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  = rapporto di espressione normalizzata.

Il risultato ottenuto è rappresentato da multipli di incremento (o decremento) del gene analita nel campione rispetto al calibratore, entrambi normalizzati con un gene di riferimento per compensare ogni differenza nella quantità di campione.

L'efficienza di amplificazione della PCR è stata determinata utilizzando la pendenza della curva standard: efficienza =  $10^{-1/\text{slope}} - 1$ . La pendenza di tale grafico è stata poi utilizzata per determinare l'efficienza dell'amplificazione. Le condizioni della PCR sono state quindi ottimizzate per generare un'efficienza di analisi > 95%, e solo le reazioni tra 95% e 100% di efficienza sono state incluse nella successiva analisi statistica.

#### **7.1.9. Analisi statistica**

I dati di real-time PCR sono stati valutati statisticamente attraverso un'analisi ANOVA ad una via, seguita dal test di comparazione multipla di Student-Newman-Keuls, e mediante un'analisi ANOVA a due vie seguita da test di Bonferroni. Le indagini statistiche sono state eseguite utilizzando il software per Windows GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software, La Jolla California, USA).

## 7.2. Risultati

L'analisi dell'estratto mediante Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technology) ha permesso di apprezzare una grande variabilità nella quantità di RNA ottenuto da ciascun campione, rimanendo comunque in un *range* adeguato per le successive indagini di biologia molecolare. Per quanto riguarda l'analisi qualitativa, nessun campione ha mostrato un valore ottimale di 260/230, ovvero prossimo a 2.0; tuttavia, tale indice di qualità dell'estratto è stato progressivamente migliorato *in itinere* mediante delle piccole modifiche della metodica di estrazione. In particolare, è stata prolungata la fase di asciugatura del pellet, in modo da favorire la completa evaporazione della soluzione alcolica per la rimozione della paraffina dal tessuto.

Al momento della valutazione quantitativa e qualitativa dell'estratto, 11 dei campioni inizialmente selezionati per il progetto di ricerca (casi 3, 16, 18, 21, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50) non sono stati considerati idonei per le successive indagini di biologia molecolare e pertanto sono stati esclusi dallo studio.

Sulla base dei criteri istopatologici stabiliti nel sistema classificativo dei tumori del SNC dell'uomo (Louis et al., 2007) i 43 campioni selezionati come idonei sono stati classificati in 13 meningiomi di grado I, 14 meningiomi di grado II e 6 meningiomi di grado III (Tab.7). Si trattava di 23 neoplasie a localizzazione cerebrale e 10 tumori spinali. Le rimanenti 10 neoplasie, tutte intracraniche, erano rappresentate dall'istotipo papillare, notoriamente tra i più aggressivi nell'uomo, e considerato di grado III nella classificazione umana del WHO. Per questo motivo i meningiomi papillari sono stati trattati in questo studio come

una categoria a sé stante e ad essi non è stato attribuito alcun grado istologico (Tab.6).

**Tabella 6.** Elenco dei 43 campioni idonei per le indagini di biologia molecolare e grado istologico.

<b>N. Archivio</b>	<b>Codice</b>	<b>Grado istologico</b>
<b>2012-2850</b>	1	meningioma papillare
<b>2012-2687</b>	2	I
<b>2012-2430</b>	4	meningioma papillare
<b>2012-1499</b>	5	I
<b>2012-1498</b>	6	meningioma papillare
<b>2012-1421</b>	7	II
<b>2012-1264</b>	8	II
<b>2012-1142</b>	9	meningioma papillare
<b>2012-731</b>	10	I
<b>2012-530</b>	11	meningioma papillare
<b>2012-517</b>	12	II
<b>2012-495</b>	13	I
<b>2012-34</b>	14	II
<b>2011-3204</b>	15	II
<b>2011-2423</b>	17	II
<b>2011-1077</b>	19	I
<b>2011-855</b>	20	III
<b>2011-393</b>	22	I
<b>2010-2095</b>	23	II
<b>2013-3870</b>	24	meningioma papillare

<b>2010-1092</b>	25	I
<b>2013-1836</b>	26	I
<b>2009-2757</b>	27	I
<b>2009-2669</b>	28	I
<b>2009-2613</b>	29	meningioma papillare
<b>2013-1530</b>	30	II
<b>2013-2335</b>	31	II
<b>2013-2336</b>	32	II
<b>2013-375</b>	33	I
<b>2013-1242</b>	34	II
<b>2011-2483</b>	35	meningioma papillare
<b>2011-2477</b>	36	III
<b>2011-2235</b>	37	I
<b>2013-3331</b>	38	II
<b>2009-2040</b>	39	III
<b>2013-2675</b>	40	II
<b>2013-2639</b>	41	II
<b>2009-662</b>	43	I
<b>2009-627</b>	44	III
<b>2012-1270</b>	51	meningioma papillare
<b>2013-1695</b>	52	meningioma papillare
<b>2010-1859</b>	53	III
<b>2010-2473</b>	54	III

La Tabella 7, la Tabella 8 e il Grafico 1 di seguito riportati riassumono i risultati circa l'espressione genica delle MMPs e dei TIMPs indagati in questo studio e l'esito dell'analisi statistica circa la loro variazione nei gradi istologici del tumore e nella categoria dei meningiomi papillari. I dati sono analizzati con il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001).

**Tabella 7.** Risultati circa l'espressione genica di MMPs e TIMPs nei meningiomi di cane.

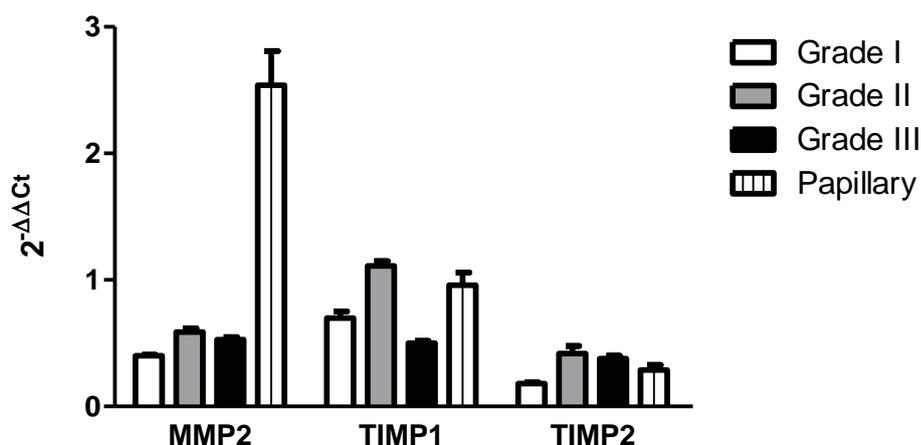
Grado	Espressione genica				Analisi dei dati			
	MMP2	TIMP1	TIMP2	MMP2/TIMP2	RSD	P-value	F	df
<b>Grado I</b>	0.40 <sup>a</sup>	0.70 <sup>b</sup>	0.18 <sup>a</sup>	2.17	0.42	***	75.70	2-36
<b>Grado II</b>	0.59 <sup>a</sup>	1.11 <sup>b</sup>	0.42 <sup>a</sup>	2.17	2.09	***	63.56	2-54
<b>Grado III</b>	0.53 <sup>a</sup>	0.50 <sup>a</sup>	0.38 <sup>a</sup>	1.39	0.04	***	15.75	2-15
<b>M. papillari</b>	2.54 <sup>a</sup>	0.96 <sup>b</sup>	0.29 <sup>c</sup>	9.40	3.59	***	47.38	2-18

df = gradi di libertà ; F = distribuzione F; RSD = deviazione standard relativa

**Tabella 8.** Risultati circa l'espressione genica di MMPs e TIMPs nei meningiomi di cane.

Tukey's Multiple Comparison Test	P
<b>Grade I vs Grade II</b>	
MMP2	ns
TIMP1	***
TIMP2	**
<b>Grade I vs Grade III</b>	
MMP2	ns
TIMP1	ns
TIMP2	ns
<b>Grade I vs Papillary</b>	
MMP2	***
TIMP1	*
TIMP2	ns
<b>Grade II vs Grade III</b>	
MMP2	ns
TIMP1	***
TIMP2	ns
<b>Grade II vs Papillary</b>	
MMP2	***
TIMP1	ns
TIMP2	ns
<b>Grade III vs Papillary</b>	
MMP2	***
TIMP1	***
TIMP2	ns

\*\*\* P<0.001; \*\* P<0.01; \* P<0.5; Ns = P>0.05



**Grafico 1.** Espressione genica di MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 nei tre gradi di meningioma e nell'istotipo papillare.

Come si evince dalle tabelle e dal grafico, nessuno dei meningiomi indagati mostrava la presenza di mRNA relativo a MMP-9, rilevabile attraverso la nostra metodica, così come nei campioni controllo. Per quanto riguarda la MMP-2, la sua espressione non risulta significativamente differente nei tre gradi istologici. Tuttavia, essa appare molto più espressa, in maniera statisticamente significativa ( $P < 0.001$ ), nei meningiomi papillari. L'espressione della TIMP-1 cresce in maniera statisticamente significativa dal grado I al II ( $P < 0.001$ ), per poi diminuire significativamente dal grado II al III ( $P < 0.001$ ), così che tra grado I e III non si apprezza una differenza significativa. Nei meningiomi papillari l'espressione della TIMP-1 non si discosta da quella del grado II, mentre risulta maggiore a quella osservata nei tumori di grado I ( $P < 0.05$ ) e nel grado III ( $P < 0.001$ ). L'espressione della TIMP-2 aumenta significativamente dal grado I al II ( $P < 0.01$ ), e non mostra altre differenze significative nei tre gradi istologici.

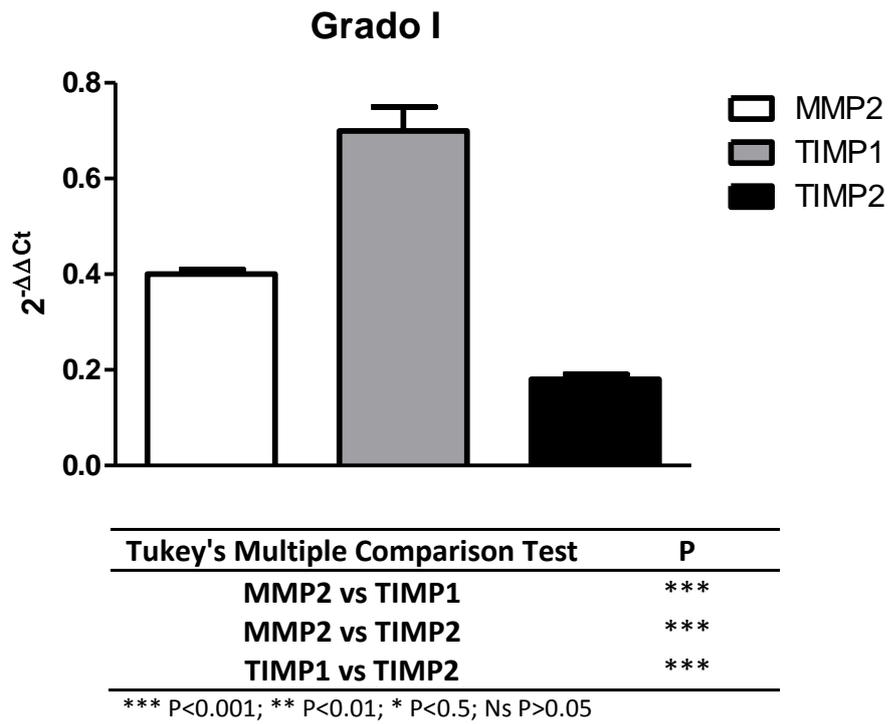
Considerando l'espressione della MMP-2 in rapporto a quella del suo inibitore naturale, il TIMP-2, tale rapporto non si modifica in modo significativo nei tre gradi istologici, mentre risulta molto più elevato nei meningiomi papillari a motivo della maggiore espressione della MMP-2.

Considerando la variazione in ciascun grado istologico dei geni indagati, le loro differenze di espressione sono risultate quasi sempre fortemente significative, ad eccezione della variazione di MMP-2 rispetto a TIMP-1 nel grado III (Tab.10, Grafici 2, 3, 4 e 5).

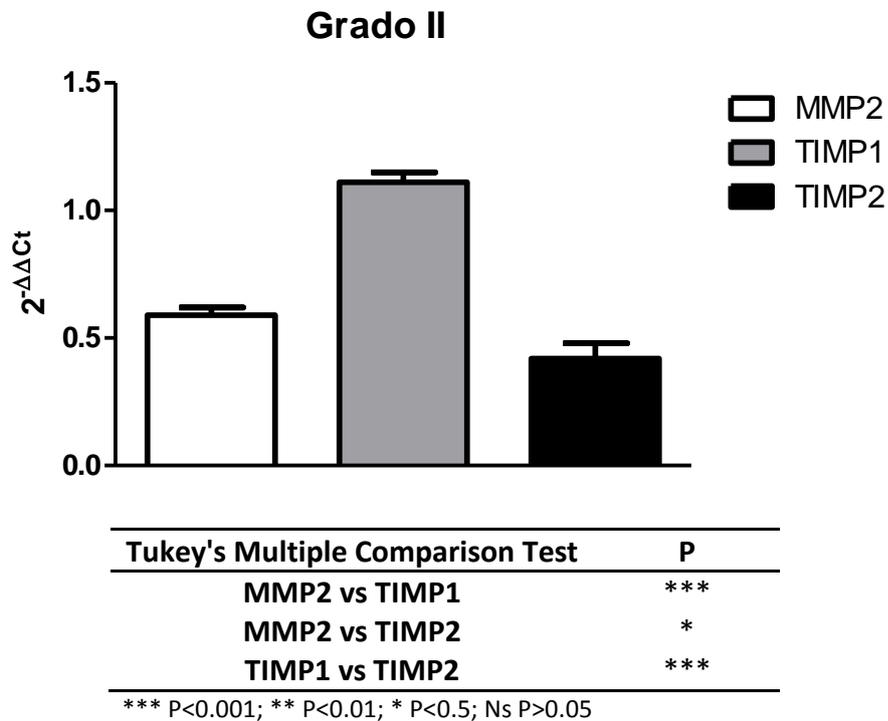
**Tabella 10.** Risultati circa l'espressione dei geni indagati in ciascun grado istologico della neoplasia.

	<b>Grado I</b>	<b>Grado II</b>	<b>Grado III</b>	<b>M. papillare</b>
<b>MMP-2 vs TIMP-1</b>	***	***	ns	***
<b>MMP-2 vs TIMP-2</b>	***	*	***	***
<b>TIMP-1 vs TIMP-2</b>	***	***	**	*

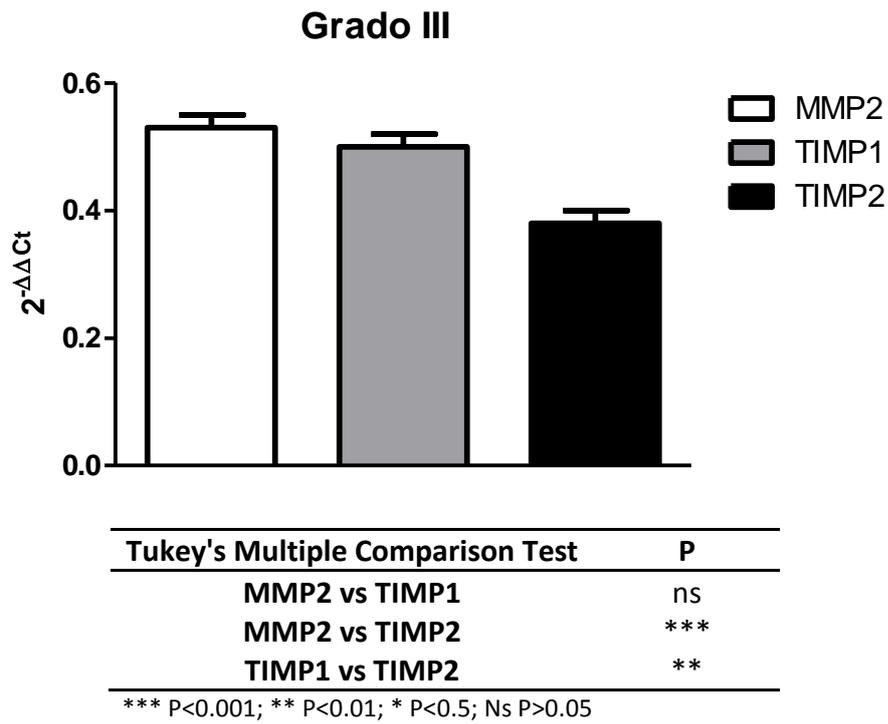
\*\*\* P<0.001; \*\* P<0.01; \* P<0.05; Ns = P>0.05



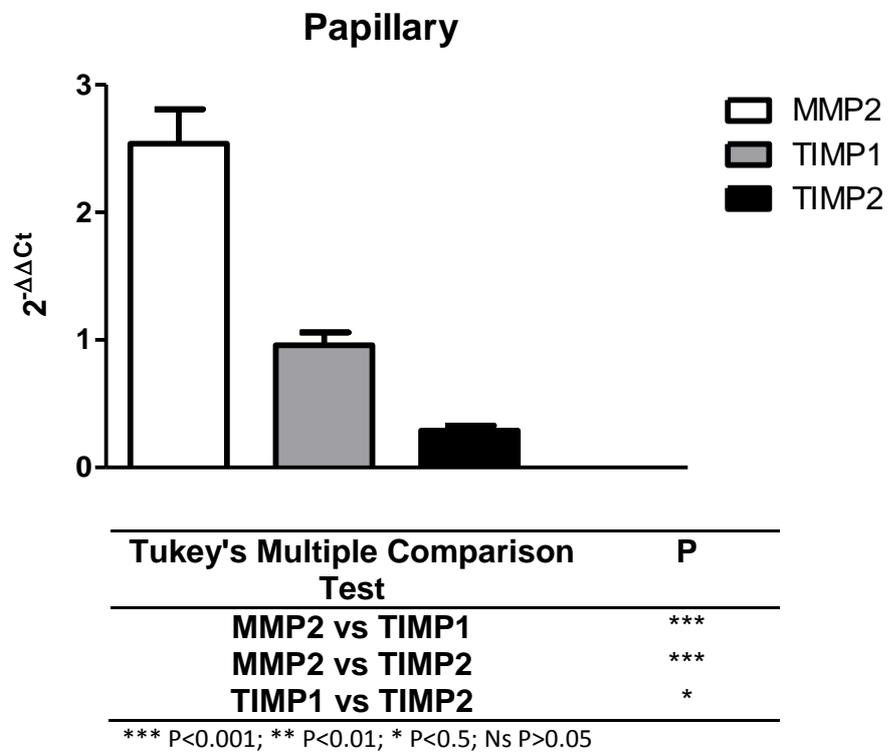
**Grafico 2.** Espressione genica di MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 nel meningioma di grado I.



**Grafico 3.** Espressione genica di MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 nel meningioma di grado II.



**Grafico 4.** Espressione genica di MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 nel meningioma di grado III.



**Grafico 5.** Espressione genica di MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 nel meningioma papillare.

### **7.3. Discussione e conclusioni finali**

Sebbene negli ultimi anni sia stato ampiamente dimostrato il coinvolgimento delle metalloproteinasi (MMPs) nella progressione neoplastica di molteplici neoplasie dell'uomo (Stearns et al., 1996; Kawano et al., 1997; Ogura et al., 1997; Kawamata et al., 1998; Sugiura et al., 1998; Garzetti et al., 1999; Dalberg et al., 2000; Yoshikawa et al., 2000) e del cane (Loukopoulos et al., 2003; Kawai et al., 2006; Aresu et al., 2011), i risultati sino ad oggi riportati sul meningioma risultano ancora contrastanti e incompleti. Per tale ragione, in questo studio abbiamo voluto indagare l'espressione genica di MMP-2, MMP-9 e dei relativi inibitori, rispettivamente TIMP-2 e TIMP-1, nel meningioma di cane, valutandone le variazioni e i rapporti nei tre gradi istologici della neoplasia, al fine di contribuire ad una maggiore comprensione circa il loro potenziale coinvolgimento nella progressione tumorale di quella che è la patologia neoplastica più frequente del SNC nel cane.

Durante la fase di elaborazione dello studio, si è partiti dall'idea di utilizzare campioni di tessuto patologico fresco, inviati dai neurochirurghi veterinari che usufruiscono del Servizio di Neuropatologia attivo nel nostro Laboratorio. Tuttavia, per poter sfruttare il gran numero di casi di meningioma di cane già archiviati, abbiamo proceduto all'estrazione dell'RNA da tessuto conservato in blocchetti di paraffina, metodica già descritta ed ampiamente utilizzata in numerosi lavori scientifici, che tuttavia nasconde alcune criticità (Maes et al., 2014). La fissazione in formalina neutra tamponata al 10% e la successiva

inclusione in paraffina rappresentano la metodica standard nella preparazione dei campioni da sottoporre ad esame istologico (Maes et al., 2014), in grado di garantire il mantenimento di un ottimo dettaglio morfologico. Tuttavia, l'RNA è una molecola estremamente labile tale che la lavorazione istologica e il prolungato stoccaggio in blocchetti di paraffina ne possono determinare la degradazione (Maes et al., 2014). Nonostante queste premesse, nel nostro studio abbiamo ottenuto RNA di buona qualità dalla maggior parte dei casi selezionati. I campioni esclusi dall'indagine, al momento della valutazione qualitativa e quantitativa dell'estratto, al contrario, lasciavano considerare lunghi tempi di stoccaggio, con verosimili effetti negativi sulla conservazione dell'acido nucleico. Inoltre, la metodica di estrazione è stata oggetto di numerosi test e modifiche *in itinere* fino al raggiungimento di risultati ottimali, in linea con quanto riportato in una recentissima *review* sull'applicazione delle metodiche di biologia molecolare ai campioni istologici, in cui si attribuisce fondamentale importanza alla "personalizzazione" dei kit commerciali di estrazione per l'ottenimento di risultati soddisfacenti (Maes et al., 2014).

In nessuno dei meningiomi indagati nel nostro studio è stato possibile osservare l'espressione di MMP-9. Tale risultato necessita tuttavia di essere interpretato con la dovuta cautela, sebbene da un punto di vista tecnico-laboratoristico non si evidenziano ragioni che possano far sospettare un risultato falso negativo. Infatti, la metodica impiegata, la RT real time PCR, è tecnica altamente specifica e sensibile. Inoltre, per la ricerca dell'mRNA della gelatinasi MMP-9 sono state impiegate sonde pubblicate e garantite, che ci siamo preoccupati di testare su

tessuti controllo durante la fase di allestimento della metodica, con risultati positivi. La totale assenza di espressione di MMP-9 appare alquanto singolare se confrontata con altri lavori pubblicati in oncologia veterinaria, in cui l'espressione di questa gelatinasi nel meningioma di cane è stata evidenziata (Mandara et al., 2009; Beltran et al., 2013), sebbene con metodiche squisitamente fenotipiche (immunoistochimica). Pertanto, il risultato del nostro lavoro potrebbe trovare giustificazione nella presenza di polimorfismi genetici localizzati nella zona compresa tra primers e sonde, già dimostrati nell'uomo, come polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), a carico del gene della MMP-9 (Scherf et al., 2010; Srivastava et al., 2010; Fu et al., 2013). Nel cane non si hanno informazioni circa la presenza di possibili polimorfismi genetici della MMP-9 prossimi alla zona del nostro amplicone. Appare dunque essenziale indagare ulteriormente tale risultato prima di poterlo considerare definitivo, procedendo alla progettazione di sonde disegnate su altre regioni dell'mRNA ed alla ricerca di eventuali SNPs a carico del gene della MMP-9.

Inoltre, il nostro dato circa l'assenza di amplificazione dell'RNA di MMP-9 potrebbe trovare giustificazione su considerazioni di caratteri più tecnico. Infatti, nei campioni controllo del nostro studio l'espressione di MMP-9 è risultata molto ridotta rispetto al gene housekeeping, lasciando supporre una sottoregolazione del gene, in accordo con quanto noto nell'uomo, nel cui Sistema Nervoso Centrale il gene della MMP-9 non risulta fisiologicamente espresso (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000100985/cancer>). Allo stesso modo, una sottoregolazione del gene potrebbe essere ipotizzata anche nei campioni

neoplastici. A sostegno di tale ipotesi, si considera il fatto che l'elettroforesi del RNA estratto dal tessuto paraffinato ha evidenziato segni di degradazione, probabilmente dovuti alla fissazione o al tempo di stoccaggio, e che i trascritti rari risentono della degradazione dell'RNA molto di più dei trascritti abbondanti (Opitz et al., 2010). Pertanto, è ragionevole pensare che nel meningioma di cane la MMP-9 sia poco espressa e che la natura dei campioni di partenza, ovvero tessuto conservato per lungo tempo in blocchetti di paraffina, abbia influenzato la possibilità di rilevare un mRNA di per sé poco trascritto.

Contrariamente a quanto rilevato per la MMP-9, nel nostro studio l'espressione di MMP-2 è stata osservata in tutte le neoplasie indagate, sebbene non sia stata rilevata alcuna variazione statisticamente significativa nei tre gradi istologici del tumore. Ciò suggerisce che la capacità di sintesi della MMP-2 da parte delle cellule meningiali neoplastiche di cane non è correlata alle caratteristiche istologiche di malignità. Tale risultato contraddice le evidenze di alcuni lavori di oncologia umana (Stearns et al., 1996; Kawano et al., 1997; Ogura et al., 1997; Kawamata et al., 1998; Sugiura et al., 1998; Garzetti et al., 1999; Dalberg et al., 2000; Yoshikawa et al., 2000) e veterinaria (Loukopoulos et al., 2003; Kawai et al., 2006; Aresu et al., 2011) sul ruolo della MMP-2 nella progressione neoplastica. Quanto al meningioma, invece, il nostro risultato trova conferma nei precedenti lavori pubblicati sul cane (Mandara et al., 2009; Beltran et al., 2013), mentre, se comparato a studi eseguiti sul meningioma di uomo, esso trova concordanze (Okada et al., 2004; von Randow et al., 2006) e discordanze (Mizoue et al., 1999; Panagoupoulus 2008).

Oggi è noto nell'uomo che i tumori intracranici più aggressivi manifestano una attività gelatinasica maggiore rispetto a tumori meno aggressivi, come il meningioma (Nakagawa, 1994 Kachra, 1999; Jäälinojä, 2000). Partendo da questo presupposto, i ricercatori da tempo indagano se questa differente espressione sia coerente anche nella progressione di grado del meningioma che, come già sottolineato, è elemento predittivo prognostico nell'uomo (Louis et al., 2007). Tuttavia, i molteplici studi che si sono susseguiti negli ultimi venti anni hanno prodotto risultati tra loro contraddittori e di difficile interpretazione. A pochi anni di distanza, infatti, il ruolo di MMP-2 e MMP-9 è stato considerato da marginale (Kirches et al., 2001) ad essenziale (Siddique et al., 2003) nella progressione neoplastica del meningioma dell'uomo. In questa nebbia di risultati, i ricercatori hanno cominciato a indagare il risultato finale dell'attività gelatinasica, ovvero la degradazione enzimatica della matrice extracellulare, che, se da una parte necessita di una maggiore espressione di tali proteine, dall'altra deve necessariamente associarsi ad una minore espressione dei loro corrispettivi inibitori (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010).

A questo proposito, è stato dimostrato che nelle neoplasie più aggressive i livelli di mRNA di MMP-2 crescono in modo inversamente proporzionale a quelli di TIMP-2 (Onisto et al., 1995; Nagel et al., 2004; Nakaichi et al., 2007). In uno studio appena pubblicato, sono stati indagati nel meningioma dell'uomo i polimorfismi genici di MMP-2 e del suo inibitore (TIMP-2), nonché il rapporto definito nella loro espressione, ottenendo risultati fortemente indicativi di quanto l'attività gelatinasica tenda ad essere squilibrata rispetto al suo inibitore

nella progressione della neoplasia meningiale (Coven et al., 2014). Al di là dei risultati ottenuti, questo studio dimostra come l'analisi della variazione del rapporto metalloproteinasi/inibitore, che ha animato il nostro progetto di ricerca, goda tuttora di grande interesse da parte della comunità scientifica internazionale.

Nel nostro studio, tuttavia, contrariamente alle aspettative, il rapporto tra espressione di MMP-2 e TIMP-2 non ha mostrato variazioni tra meningiomi di grado I e II, ed è apparso addirittura più basso nei tumori di terzo grado. Tutto ciò lascia supporre che tale rapporto svolga un ruolo marginale, almeno nella progressione morfologica del tumore, rispetto ad altri eventuali *pathway* molecolari, o che subisca comunque gli effetti di meccanismi regolatori nel processo di traduzione della proteina, fase successiva della trascrizione dell'mRNA, di cui resta da indagarne le tracce. Tale risultato lascia pertanto cadere l'ipotesi che sia l'espressione differenziale dell'inibitore nei tre gradi istologici del meningioma di cane a condurre ad una attività proteasica differente e crescente dal grado I al III. Pertanto, stando a quanto recentemente riportato nell'uomo (Coven et al., 2014), il nostro risultato sembra evidenziare un'interessante variante nella biologia del meningioma di cane, a fronte di numerose e significative analogie e somiglianze con il meningioma dell'uomo (Thomson et al., 2005; Thomas et al., 2009), da cui partire per future indagini volte a chiarire le fasi successive della sintesi di MMP-2 e del suo inibitore TIMP-2.

Molto interessanti sono apparsi i risultati circa l'espressione di MMP-2 e il suo rapporto con l'espressione di TIMP-2 in un istotipo di meningioma alquanto singolare, il meningioma papillare. In questo studio i meningiomi riferibili all'istotipo papillare hanno mostrato livelli di mRNA di MMP-2 ben più alti di quelli osservati negli altri istotipi. Allo stesso modo, il rapporto di tale molecola con il suo inibitore TIMP-2 è risultato fortemente sbilanciato verso l'attività proteasica.

Nell'uomo il meningioma papillare viene considerato una variante che, a dispetto di una scarsa malignità istologica, mostra un comportamento biologico estremamente aggressivo, con spiccata tendenza all'infiltrazione del parenchima cerebrale adiacente, alti tassi di recidiva post-operatoria e metastatizzazione al di fuori del nevrasse (Louis et al., 2007). Per tale ragione, in patologia umana il riconoscimento di un pattern di crescita papillare in più del 50% della neoplasia determina l'attribuzione del grado III al tumore, anche in assenza di caratteri di malignità istologica. Nel cane, il meningioma papillare è un istotipo ben noto, incluso dalla classificazione WHO tra le varianti istologiche benigne del tumore (Koestner et al., 1999). In letteratura sono descritti 9 casi di meningioma papillare del cane, la maggior parte dei quali come case report (Schulman et al., 1992; Kaldrymidou et al., 2001; Barnhart et al., 2002; Wall et al., 2005; Montoliu et al., 2006; Harms et al., 2009; Barreau et al., 2010), e non esistono ad oggi studi che abbiano indagato il comportamento biologico di questa variante verificandone se, come nell'uomo, essa si associ ad una prognosi infausta. Oggi sappiamo, da un'analisi di correlazione clinico-patologica da noi condotta

parallelamente allo studio in discussione, che anche nel cane il meningioma papillare esprime un comportamento biologico aggressivo (risultati in pubblicazione). Questi primi dati ci hanno spinto a considerare anche in questo studio i meningiomi papillari come una categoria a sé stante, per la quale abbiamo dimostrato un rapporto MMP-2/TIMP-2 più elevato in modo statisticamente significativo e pertanto estremamente sbilanciato a favore dell'attività proteasica, rispetto ai tre gradi istologici del tumore. Questo risultato appare altresì interessante se comparato con la spiccata tendenza all'infiltrazione del parenchima adiacente e il conseguente alto tasso di recidiva dimostrato da questo tipo di neoplasia nell'uomo (Louis et al., 2007).

Se con successivi studi fenotipici venisse confermata che all'elevata trascrizione di mRNA consegue anche una elevata traduzione della molecola in proteina, la spiccata attività proteasica potrebbe essere ragionevolmente ritenuta responsabile dell'alto tasso di recidiva da noi stessi riscontrato nello studio clinico-patologico condotto sui meningiomi papillari.

Quanto all'espressione di TIMP-1, questa è risultata crescente, in maniera statisticamente significativa, dal grado I al II, per poi diminuire nuovamente nel grado III, tanto che tra meningiomi benigni ed anaplastici non è stata apprezzata alcuna differenza sostanziale. I meningiomi papillari, al contrario, hanno mostrato un livello di espressione di TIMP-1 sovrapponibile a quello dei meningiomi atipici (grado II). In assenza dell'espressione di MMP-9, di cui TIMP-1 è inibitore, tali risultati risultano di difficile interpretazione. In realtà, TIMP-1

agisce da inibitore anche di altre MMPs, oltre che svolgere in maniera autonoma e indipendente una serie di funzioni, dalle quali scaturisce un potenziale biologico inaspettato che sta riscuotendo grande interesse nella comunità scientifica internazionale (Ries, 2014). Questa molecola, infatti, quando non legata a MMP-9, sembra capace di stimolare l'attività proliferativa delle cellule neoplastiche (Stetler Stevenson et al., 1992; Hayakawa et al., 1994; Saika et al., 1998) svolgendo anche attività anti-apoptotica (Guedez et al., 1998). Nell'interpretazione dei nostri risultati, pertanto, occorre tener conto di tali recenti acquisizioni circa il potenziale coinvolgimento di TIMP-1 nella progressione neoplastica (Ries, 2014). Infatti, se consideriamo TIMP-1 nel suo ruolo di inibitore dell'attività proteasica, ci saremmo aspettati una progressiva riduzione dei suoi livelli di espressione al crescere del grado istologico, a parità di espressione della MMP-9. Al contrario, invece, tumori di grado I e III, molto diversi nei caratteri istopatologici di malignità, hanno mostrato i medesimi livelli di espressione dell'inibitore, lasciando cadere l'ipotesi di un ruolo di tale molecola nella progressione morfologica della neoplasia. Allo stesso modo, l'elevata espressione di TIMP-1 nei meningiomi papillari, per i quali si sospetta una spiccata tendenza alla malignità biologica, risulta di difficile interpretazione, in assenza di dati certi relativi alla espressione di MMP-9.

Pertanto, se consideriamo l'addizionale potenziale biologico del TIMP-1 nella progressione neoplastica recentemente messo in luce, la crescente espressione dal I al II grado e nel gruppo dei meningiomi papillari andrebbe verosimilmente associata a meccanismi biologici indipendenti dall'espressione di MMP-9. Al

contrario, la presenza nel grado III di meningioma di valori di TIMP-1 sovrapponibili a quelli espressi nel grado I lascia supporre l'intervento di ben altri meccanismi biomolecolari nella progressione del tumore dal grado II al grado III.

In conclusione, sebbene i nostri risultati debbano essere ancora considerati preliminari e passibili di ulteriori indagini ed approfondimenti, questo studio rappresenta uno dei primi esempi di ricerca volta a chiarire aspetti di espressione genica del meningioma di cane, applicando metodiche di biologia molecolare a materiale paraffinato d'archivio, ricca risorsa che purtroppo troppo spesso viene sottovalutata e relegata alle sole indagini istopatologiche. Come già sottolineato nella parte introduttiva del lavoro, con questo studio abbiamo indagato la produzione di mRNA, la prima di una serie di fasi che, come in una perfetta catena di montaggio, portano infine alla produzione della proteina. Tuttavia, nell'ottica del più ampio filone di ricerca che il nostro gruppo porta avanti, volto a chiarire le basi molecolari della progressione neoplastica del meningioma del cane, ci è sembrato opportuno iniziare dal gradino più basso di un meccanismo molecolare, espressione delle MMPs e loro inibitori, nella speranza di svelarlo passo dopo passo per arrivare infine ad un quadro completo dell'attività biologica del loro rapporto nella progressione neoplastica del tumore.

Tra tutti i risultati ottenuti quello che sicuramente appare più sorprendente è il riconoscimento di un sottogruppo di neoplasie meningiali, i meningiomi papillari, che non condividono tra loro solamente l'aspetto istologico, ma anche le caratteristiche molecolari. Al di là dell'importanza scientifica che tale risultato

assume, ciò che esso implica è la ormai imprescindibile necessità di considerare il meningioma di cane come un gruppo di neoplasie morfologicamente e biologicamente eterogeneo che merita di essere indagato nelle sue diverse espressioni istologiche e biomolecolari, oltre che comportamentali.

## **Bibliografia**

Aarhus M, Bruland O, Bredholt G, Lybaek H, Husebye ES, Krossnes BK, Vedeler C, Wester K, Lund-Johansen M, Knappskog PM. Microarray analysis reveals down-regulation of the tumour suppressor gene WWOX and up-regulation of the oncogene TYMS in intracranial sporadic meningiomas. *J Neurooncol* 2008; 88(3):251-9.

Aarhus M, Lund-Johansen M, Knappskog PM. Gene expression profiling of meningiomas: current status after a decade of microarray-based transcriptomic studies. *Acta Neurochir (Wien)* 2011; 153(3):447-56.

Adamo PF, Cantile C, Steinberg H. Evaluation of progesterone and estrogen receptor expression in 15 meningiomas of dogs and cats. *Am J Vet Res* 2003; 64(10):1310-8.

Ahmed A, Tollefsbol TO. Telomerase, telomerase inhibition, and cancer. *J Anti Aging Med* 2003; 6(4):315-25.

Ahonen M, Poukkula M, Baker AH, Kashiwagi M, Nagase H, Eriksson JE, Kahari VM. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene* 2003; 22(14):2121–2134.

Akahane T, Akahane M, Shah A, Connor CM, Thorgeirsson UP. TIMP-1 inhibits microvascular endothelial cell migration by MMP-dependent and MMP-independent mechanisms. *Exp Cell Res* 2004; 301(2):158–167.

Akhtar N, Rasheed Z, Ramamurthy S, Anbazhagan AN, Voss FR, Haqqi TM. MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2010; 62(5):1361-71.

- Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993; 68(1):4-17.
- Alguacil-Garcia A, Pettigrew NM, Sima AA. Secretory meningioma. A distinct subtype of meningioma. *Am J Surg Pathol* 1986; 10(2):102-11.
- Alvarez F, Roda JM, Pérez Romero M, Morales C, Sarmiento MA, Blázquez MG. Malignant and atypical meningiomas: a reappraisal of clinical, histological, and computed tomographic features. *Neurosurgery* 1987; 20(5):688-94.
- Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol* 2007; 48(4):323-34.
- Andersson U, Malmer B, Bergenheim AT, Brännström T, Henriksson R. Heterogeneity in the expression of markers for drug resistance in brain tumors. *Clin Neuropathol*. 2004; 23(1):21-7.
- Aresu L, Giantin M, Morello E, Vascellari M, Castagnaro M, Lopparelli R, Zancanella V, Granato A, Garbisa S, Aricò A, Bradaschia A, Mutinelli F, Dacasto. M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. *BMC Vet Res* 2011; 4(7):33.
- Argyle DJ, Nasir L. Telomerase: a potential diagnostic and therapeutic tool in canine oncology. *Vet Pathol* 2003; 40(1):1-7.
- Arıcan M, Ceylan C. Metalloproteinases in canine experimental traumatic keratoconjunctivitis. *Zentralbl Veterinarmed A* 1999; 46(9):527-532.
- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990; 61(7):1303-13.

- Assefa G, Ashenafi S, Munie T. Meningiomas: clinical correlates, skull x-ray, CT and pathological evaluations. *Ethiop Med J* 2006; 44(3):263-7.
- Axlund TW, McGlasson ML, Smith AN. Surgery alone or in combination with radiation therapy for treatment of intracranial meningiomas in dogs: 31 cases (1989-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2002; 221: 1597-600.
- Bagley RS, Gavin PR. Seizures as a complication of brain tumors in dogs. *Clin Tech Small Anim Pract* 1998; 3(3):179-84.
- Bagley RS, Silver GM, Gavin PR. Cerebellar cystic meningioma in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 2000; 36(5):413-5.
- Bagley RS: Coma, stupor and behavioral change. In : *BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology*, ed. Platt SR and Olby NJ, 3rd ed., pp. 113-132. BSAVA, Gloucester, UK, 2004.
- Bailey CS, Higgins RJ. Characteristics of cerebrospinal fluid associated with canine granulomatous meningoencephalomyelitis: a retrospective study. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 188(4):418-21.
- Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest* 1998; 101(6):1478–1487.
- Barnhart KF, Wojcieszyn J, Storts RW. Immunohistochemical staining patterns of canine meningiomas and correlation with published immunophenotypes. *Vet Pathol* 2002; 39:311-21.

- Barreau P, Dunn K, Fourie Y. Canine meningioma: a case report of a rare subtype and novel atlanto basioccipital surgical approach. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2010; 23:372-6.
- Barresi V, Vitarelli E, Tuccari G, Barresi G. MMP-9 expression in meningiomas: a prognostic marker for recurrence risk? *J Neurooncol* 2011; 102(2):189-96.
- Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297.
- Beltran E, Matiasek K, De Risio L, de Stefani A, Feliu-Pascual AL, Matiasek LA. Expression of MMP-2 and MMP-9 in benign canine rostromentorial meningiomas is not correlated to the extent of peritumoral edema. *Vet Pathol* 2013; 50(6):1091-8.
- Benzel EC, Gelder FB. Correlation between sex hormone binding and peritumoral edema in intracranial meningiomas. *Neurosurgery* 1988; 23(2):169-74.
- Bernot D, Barruet E, Poggi M, Bonardo B, Alessi MC, Peiretti F. Down-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase- 3 (TIMP-3) expression is necessary for adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2010; 285(9):6508–6514.
- Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ, Dubertret L. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol* 1991; 97(4):679–685.
- Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(6):a003129.

- Bickerstaff ER, Small JM, Guest IA. The relapsing course of certain meningiomas in relation to pregnancy and menstruation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1958; 21(2):89-91.
- Bignami A, Asher R. Some observations on the localization of hyaluronic acid in adult, newborn and embryonal rat brain. *Int J Dev Neurosci* 1992; 10(1):45-57.
- Biller BJ, Kitchel B, Casey D, Cadile DA Biller BJ, Kitchel B, Casey D, Cadile DA. Evaluation of an assay for detecting telomerase activity in neoplastic tissues of dogs. *Am J Vet Res* 1998; 59(12):1526–1528.
- Bitzer M, Opitz H, Popp J, Morgalla M, Gruber A, Heiss E, Voigt K. Angiogenesis and brain oedema in intracranial meningiomas: influence of vascular endothelial growth factor. *Acta Neurochir (Wien)* 1998; 140(4):333-40.
- Bitzer M, Topka H, Morgalla M, Friese S, Wöckel L, Voigt K. Tumor-related venous obstruction and development of peritumoral brain edema in meningiomas. *Neurosurgery* 1998; 42(4):730-7.
- Bitzer M, Wöckel L, Luft AR, Wakhloo AK, Petersen D, Opitz H, Sievert T, Ernemann U, Voigt K. The importance of pial blood supply to the development of peritumoral brain edema in meningiomas. *J Neurosurg* 1997; 87(3):368-73.
- Bitzer M, Wöckel L, Morgalla M, Keller C, Friese S, Heiss E, Meyermann R, Grote E, Voigt K. Peritumoural brain oedema in intracranial meningiomas: influence of tumour size, location and histology. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139(12):1136-1142.
- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350(6319):569-73.

- Blankenstein MA, Verheijen FM, Jacobs JM, Donker TH, van Duijnhoven MW, Thijssen JH. Occurrence, regulation, and significance of progesterone receptors in human meningioma. *Steroids* 2000; 65(10-11):795-800.
- Boldrini L, Pistolesi S, Gisfredi S, Ursino S, Lupi G, Caniglia M, Pingitore R, Basolo F, Parenti G, Fontanini G. Telomerase in intracranial meningiomas. *Int J Mol Med* 2003; 12(6):943-947.
- Bouloumié A, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1999; 41(3):773-80.
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 2010; 20(3):161-8.
- Bradac GB, Ferszt R, Bender A, Schörner W. Peritumoral edema in meningiomas. A radiological and histological study. *Neuroradiology* 1986; 28(4):304-12.
- Brandis A, Mirzai S, Tatagiba M, Walter GF, Samii M, Ostertag H. Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in meningiomas: correlation with clinical and histological features. *Neurosurgery* 1993; 33(2):212-7.
- Brantsch KD, Metzler G, Maennlin S, Breuninger H. A meningioma of the scalp that might have developed from a rudimentary meningocele. *Clin Exp Dermatol* 2009; 34(8):e792-4.
- Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477(1-2):267-83.

- Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(1):55-71.
- Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* 2010; 112(1):3-25.
- Brummer O, Böhmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry KU, Kühnle H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation – an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 2002; 84(2):222–227.
- Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E. Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* 2006; 49(2):178-87.
- Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E. Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* 2006;49:178-87.
- Buetow MP, Buetow PC, Smirniotopoulos JG. Typical, atypical, and misleading features in meningioma. *Radiographics*. 1991 Nov;11(6):1087-106.
- Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS. Intracranial meninges: Meningioma. In: Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS, eds. *Surgical Pathology of the Nervous System and its Covering*, 4<sup>th</sup> ed. New York: Curchill Livingstone; 2002: 49-71.
- Cahill DW, Bashirelahi N, Solomon LW, Dalton T, Salcman M, Ducker TB. Estrogen and progesterone receptors in meningiomas. *J Neurosurg* 1984; 60(5):985-993.
- Carlson KM, Bruder C, Nordenskjöld M, Dumanski JP. 1p and 3p deletions in meningiomas without detectable aberrations of chromosome 22 identified by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20(4):419-24.

- Carrillo JM, Saftary D, Greenlee P. Intracranial neoplasm and associated inflammatory response from the central nervous system, *J Am Anim Hosp Assoc* 1986; 22: 367-373.
- Carter WG, Wayner EA. Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J Biol Chem* 1988; 263(9):4193-201.
- Carvalho LH, Smirnov I, Baia GS, Modrusan Z, Smith JS, Jun P, Costello JF, McDermott MW, Vandenberg SR, Lal A. Molecular signatures define two main classes of meningiomas. *Mol Cancer* 2007; 15(6):64.
- Castells X, García-Gómez JM, Navarro A, Acebes JJ, Godino O, Boluda S, Barceló A, Robles M, Ariño J, Arús C. Automated brain tumor biopsy prediction using single-labeling cDNA microarrays-based gene expression profiling. *Diagn Mol Pathol* 2009; 18(4):206-18.
- Caterina JJ, Yamada S, Caterina NCM, Longenecker G, Holmback K, Shi J, et al. Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2(Timp-2) gene alters proMMP-2 activation. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:26416–26422.
- Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001; 11(11):S37-43.
- Chen KC, Wang YS, Hu CY, Chang WC, Liao YC, Dai CY, Juo SH. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB J* 2011; 25(5):1718-28.

- Chen TC, Zee CS, Miller CA, Weiss MH, Tang G, Chin L, Levy ML, Apuzzo ML. Magnetic resonance imaging and pathological correlates of meningiomas. *Neurosurgery* 1992; 31(6):1015-21.
- Claus EB, Park PJ, Carroll R, Chan J, Black PM. Specific genes expressed in association with progesterone receptors in meningioma. *Cancer Res* 2008; 68(1):314-22.
- Constantini S, Tamir J, Gomori MJ, Shohami E. Tumor prostaglandin levels correlate with edema around supratentorial meningiomas. *Neurosurgery* 1993; 33(2):204-10.
- Coughlan AR, Carter SD, Robertson DH. Zymographic analysis of synovial fluid metalloproteinases in canine osteoarthritis. *Vet Comp Orthop Taumatol* 1995; 8:62.
- Coughlan AR, Robertson DH, Bennett D, May C, Beynon RJ, Carter SD. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine rheumatoid arthritis. *Vet Rec* 1998; 143(8):219-223.
- Courtay-Cahen C, Platt SR, De Risio L, Starkey MP. Preliminary analysis of genomic abnormalities in canine meningiomas. *Vet Comp Oncol* 2008; 6(3):182-92.
- Coven I, Ozer O, Ozen O, Sahin FI, Altinors N. Presence of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms and immunohistochemical expressions in intracranial meningiomas. *J Neurosurg* 2014; 26:1-5.
- Cuevas IC, Slocum AL, Jun P, Costello JF, Bollen AW, Riggins GJ, McDermott MW, Lal A. Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway. *Cancer Res* 2005; 65(12):5070-5.

- Curry TE Jr., Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* 2003; 24(4):428–465.
- Cushing H, Eisenhardt L. *Meningiomas. Their Classification, Regional Behavior, Life History and Surgical End Results.* Springfield, Ill: Charles C Thomas, 785, 1938.
- Dalberg K, Eriksson E, Enberg U, Kjellman M, Bäckdahl M. Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer. *World J Surg* 2000; 24(3):334-340.
- De Lahunta A, Glass E, 2009. Visual System. In: De Lahunta A, Glass E (Eds), *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology.* Elsevier, Philadelphia, 402-403.
- De Monte F, Marmore E, Al-Mefty O. Meningiomas. In: Kaye AH, Laws ER, eds. *Brain Tumors*, 2<sup>nd</sup> ed. London: Churchill Livingstone; 2001:719-750.
- De Vries J, Wakhloo AK. Cerebral oedema associated with WHO-I, WHO-II, and WHO-III-meningiomas: correlation of clinical, computed tomographic, operative and histological findings. *Acta Neurochir (Wien)* 1993; 125(1-4):34-40.
- Derry JM, Barnard PJ. Physical linkage of the A-raf-1, properdin, synapsin I, and TIMP genes on the human and mouse X chromosomes. *Genomics* 1992; 12:632–638.
- Di Bacco A, Gill G. The secreted glycoprotein CREG inhibits cell growth dependent on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Oncogene* 2003; 22(35):5436-45.

- Dickinson PJ, Sturges BK, Higgins RJ, Roberts BN, Leutenegger CM, Bollen AW, LeCouteur RA. Vascular endothelial growth factor mRNA expression and peritumoral edema in canine primary central nervous system tumors. *Vet Pathol* 2008; 45(2):131-139.
- Dickinson PJ, Sturges BK, Kass PH, LeCouteur RA. Characteristics of cisternal cerebrospinal fluid associated with intracranial meningiomas in dogs: 56 cases (1985-2004). *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228(4):564-7.
- Dickinson PJ, Surace EI, Cambell M, Higgins RJ, Leutenegger CM, Bollen AW, LeCouteur RA, Gutmann DH. Expression of the tumor suppressor genes NF2, 4.1B, and TSLC1 in canine meningiomas. *Vet Pathol* 2009; 46(5):884-92.
- Dieterich M, Bartenstein P, Spiegel S, Bense S, Schwaiger M, Brandt T. Thalamic infarctions cause side-specific suppression of vestibular cortex activations. *Brain* 2005; 128(Pt 9):2052-67.
- Ding YS, Wang HD, Tang K, Hu ZG, Jin W, Yan W. Expression of vascular endothelial growth factor in human meningiomas and peritumoral brain areas. *Ann Clin Lab Sci* 2008; 38(4):344-51.
- Domingo Z, Rowe G, Blamire AM, Cadoux-Hudson TA. Role of ischaemia in the genesis of oedema surrounding meningiomas assessed using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Br J Neurosurg* 1998; 12(5):414-8.
- Donnell MS, Meyer GA, Donegan WL. Estrogen-receptor protein in intracranial meningiomas. *J Neurosurg* 1979; 50(4):499-502.

- Dumanski JP, Carlbom E, Collins VP, Nordenskjöld M. Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(24):9275-9.
- Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjöld M, Collins VP. Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* 1990; 50(18):5863-7.
- Durbeej M. Laminins. *Cell Tissue Res* 2010; 339:259–268.
- Elster AD, Challa VR, Gilbert TH, Richardson DN, Contento JC. Meningiomas: MR and histopathologic features. *Radiology* 1989; 170(3 Pt 1):857-62.
- Engelhard HH. Progress in the diagnosis and treatment of patients with meningiomas. Part I: Diagnostic imaging, preoperative embolization. *Surge Neurol* 2001 55:89-101.
- Falchetti ML, Larocca LM, Pallini R. Telomerase in brain tumors. *Childs Nerv Syst* 2002; 18(3-4):112-117.
- Fata JE, Leco KJ, Moorehead RA, Martin DC, Khokha R. Timp-1 is important for epithelial proliferation and branching morphogenesis during mouse mammary development. *Dev Biol* 1999; 211(2):238–254.
- Fathallah-Shaykh HM, He B, Zhao LJ, Engelhard HH, Cerullo L, Lichtor T, Byrne R, Munoz L, Von Roenn K, Rosseau GL, Glick R, Sherman C, Farooq K. Genomic expression discovery predicts pathways and opposing functions behind phenotypes. *J Biol Chem* 2003; 278(26):23830-3.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18(1):4-25.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6):669-676.

Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11(6):617-24.

Fèvre-Montange M, Champier J, Durand A, Wierinckx A, Honnorat J, Guyotat J, Jouvét A. Microarray gene expression profiling in meningiomas: differential expression according to grade or histopathological subtype. *Int J Oncol* 2009; 35(6):1395-407.

Figarella-Branger D, Pellissier JF, Bouillot P, Bianco N, Mayan M, Grisoli F, Rougon G. Expression of neural cell-adhesion molecule isoforms and epithelial cadherin adhesion molecules in 47 human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Mod Pathol* 1994; 7(7):752-61.

Figarella-Branger D, Roche PH, Daniel L, Dufour H, Bianco N, Pellissier JF. Cell-adhesion molecules in human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997; 23(2):113-22.

Fingerroth JM, Prata RG, Patnaik AK. Spinal meningiomas in dogs: 13 cases (1972-1987). *J Am Vet Med Assoc* 1987; 191(6):720-6.

Fisher RS, Van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel Jr J. Epileptic seizure and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46: 470-472.

- Folgueras AR, Pendàs AM, Sànchez LM, Lòpez-otìn C., Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004; 48(5–6):411–424.
- Foster ES, Carrillo JM, Patnaik AK. Clinical signs of tumors affecting the rostral cerebrum in 43 dogs. *J Vet Intern Med* 1988; 2:71–74.
- Fu F, Wang C, Chen LM, Huang M, Huang HG. The influence of functional polymorphisms in matrix metalloproteinase 9 on survival of breast cancer patients in a Chinese population. *DNA Cell Biol* 2013; 32(5):274-82.
- Fujise N, Nanashim A, Taniguchi Y, Matsuo S, Hatano K, Matsumoto Y, Tagawa Y, Ayabe H. Prognostic impact of cathepsin B and matrix metalloproteinase-9 in pulmonary adenocarcinomas by immunohistochemical study. *Lung Cancer* 2000; 27(1):19-26.
- Fulkerson DH, Horner TG, Hattab EM. Histologically benign intraventricular meningioma with concurrent pulmonary metastasis: case report and review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg* 2008; 110(4):416-419.
- Gallagher JG, Berg J, Knowles KE, Williams LL, Bronson RT. Prognosis after surgical excision of cerebral meningiomas in cats: 17 cases (1986-1992). *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 1437-1440.
- Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Pugnali A, De Nictolis M, Amati S, Romanini C, Biagini G. Expression of vascular endothelial growth factor related to 72-kilodalton metalloproteinase immunostaining in patients with serous ovarian tumors. *Cancer* 1999; 85(10):2219-2225.

- Gasson JC, Bersch N, Golde DW. Characterization of purified human erythroid-potentiating activity. *Prog Clin Biol Res* 1985; 184:95–104.
- Gavin PR, Fike JR, Hoopes PJ. Central nervous system tumors. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1995; 10(3):180-9.
- Giantin M, Aresu L, Benali S, Aricò A, Morello EM, Martano M, Vascellari M, Castagnaro M, Lopparelli RM, Zancanella V, Granato A, Mutinelli F, Dacasto M. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. *J Comp Pathol* 2012; 147(4):419-29.
- Gilbert JJ, Paulseth JE, Coates RK, Malott D. Cerebral edema associated with meningiomas. *Neurosurgery* 1983; 12(6):599-605.
- Gilbert SJ, Wotton PR, Tarlton JF, Duance VC, Bailey AJ. Increased expression of promatrix metalloproteinase-9 and neutrophil elastase in canine dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 1997; 34(2):377-383.
- Gilmore DR. Neoplasia of the cervical spinal-cord and vertebrae in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983; 19: 1009-1014.
- Go KG, Wilmink JT, Molenaar WM. Peritumoral brain edema associated with meningiomas. *Neurosurgery* 1988; 23(2):175-9.
- Goldman CK, Bharara S, Palmer CA, Vitek J, Tsai JC, Weiss HL, Gillespie GY. Brain edema in meningiomas is associated with increased vascular endothelial growth factor expression. *Neurosurgery* 1997; 40:1269-1277.

- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74(2):111-22.
- Gomis-Rüth FX. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem* 2009; 284(23):15353-15357.
- Gordon LE, Thacher C, Matthiesen DT, Joseph RJ. Results of craniotomy for the treatment of cerebral meningioma in 42 cats. *Vet Surg* 1994; 23:94-100.
- Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res* 2010; 339:247–257.
- Gottfried ON, Gluf W, Quinones-Hinojosa A, Kan P, Schmidt MH. Spinal meningiomas: surgical management and outcome. *Neurosurg Focus* 2003; 14(6):e2.
- Graham JP, Newell SM, Voges AK, Roberts GD, Harrison JM. The dural tail sign in the diagnosis of meningiomas. *Vet Radiol Ultrasound* 1998; 39(4):297-302.
- Greco JJ, Aiken SA, Berg JM, Monette S, Bergman PJ. Evaluation of intracranial meningioma resection with a surgical aspirator in dogs: 17 cases (1996-2004). *J Am Vet Med Assoc* 2006; 229(3):394-400.
- Green TR, Fellman JH, Eicher AL, Pratt KL. Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1073(1):91-7.
- Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmitkowski M. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2012; 50(1):12-9.

- Gross J. How tadpoles lose their tails: path to discovery of the first matrix metalloproteinase. *Matrix Biol* 2004; 23(1):3-13.
- Grunberg SM, Weiss MH, Spitz IM, Ahmadi J, Sadun A, Russell CA, Lucci L, Stevenson LL. Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestosterone agent mifepristone. *J Neurosurg* 1991; 74(6):861-866.
- Grunberg SM. Role of antiprogesterone therapy for meningiomas. *Hum Reprod* 1994; 9 Suppl 1:202-7.
- Guedez L, Courtemanch L, Stetler-Stevenson M. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* 1998; 92(4):1342–1349.
- Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, Stetler-Stevenson M. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases- 1. *J Clin Invest* 1998; 102(11):2002–2010.
- Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84(3):345-57.
- Halpin SF. Supratentorial Tumors. In: Gillespie JE, Jackson A, eds. *MRI and CT of the brain*. London: Arnold 2000: 122-125.
- Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2005; 115(6):849–860.
- Hankins GR, Sasaki T, Lieu AS, Saulle D, Karimi K, Li JZ, Helm GA. Identification of the deleted in liver cancer 1 gene, *DLC1*, as a candidate meningioma tumor suppressor. *Neurosurgery* 2008; 63(4):771-80.

Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G, Piotrowski A, Hellström AR, Mantripragada K, Jarbo C, Mathiesen T, Dumanski JP. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* 2007; 8:16.

Harms NJ, Dickinson RM, Nibblett BM, Wobeser BK: What is your diagnosis? Intracranial mass in a dog. *Vet Clin Pathol.* 2009;38:537-40.

Harrigan MR. Angiogenic factors in the central nervous system. *Neurosurgery* 2003; 53(3):639-60.

Hashizume K. Analysis of utero-placental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. *J Reprod Dev* 2007; 53(1):1–11.

Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases- 2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 1994; 107(Pt 9):2373–2379.

Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases- 1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992; 298:29–32.

Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 1989; 10(12):423-8.

Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun* 1997; 4(6):399-411.

- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000; 148(4):779-90.
- Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1014:155-63.
- Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:365-400.
- Herrera GA, Mendoza A. Primary canine cutaneous meningioma. *Vet Pathol* 1981; 18(1):127-130.
- Herting B, Meixensberger J, Roggendorf W, Reichmann H. Metabolic patterns in meningiomas. *J Neurooncol* 2003; 65(2):119-23.
- Higgins JN, Burnet NG, Schwindack CF, Waters A. Severe brain edema caused by a meningioma obstructing cerebral venous outflow and treated with venous sinus stenting. Case report. *J Neurosurg* 2008; 108(2):372-6.
- Holland CT, Holland JT, Rozmanec M. Unilateral facial myokymia in a dog with an intracranial meningioma. *Aust Vet J* 2010; 88(9):357-61.
- Hou J, Kshetry VR, Selman WR, Bambakidis NC. Peritumoral brain edema in intracranial meningiomas: the emergence of vascular endothelial growth factor-directed therapy. *Neurosurg Focus* 2013; 35(6):E2.
- Hsu DW, Efid JT, Hedley-Whyte ET. Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 1997; 86(1):113-120.

- Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1996; 1(2):188-94.
- Hulanicka M, Garncarz M, Parzeniecka-Jaworska M, Jank M. The transcriptomic profile of peripheral blood nuclear cells in dogs with heart failure. *BMC Genomics* 2014; 15(1):509.
- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69(1):11-25.
- Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009; 326:1216–1219.
- Ide T, Uchida K, Suzuki K, Kagawa Y, Nakayama H. Expression of cell adhesion molecules and doublecortin in canine anaplastic meningiomas. *Vet Pathol* 2011; 48(1):292-301.
- li M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231(1):20-7.
- Iivanainen E, Kähäri VM, Heino J, Elenius K. Endothelial cell-matrix interactions. *Microsc Res Tech* 2003; 60(1):13-22.
- Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1995; 270(34):19761-19766.
- Ildan F, Tuna M, Göçer AP, Boyar B, Bağdatoğlu H, Sen O, Hacıyakupoğlu S, Burgut HR. Correlation of the relationships of brain-tumor interfaces, magnetic resonance

- imaging, and angiographic findings to predict cleavage of meningiomas. *J Neurosurg* 1999; 91(3):384-90.
- Inamura T, Nishio S, Takeshita I, Fujiwara S, Fukui M. Peritumoral brain edema in meningiomas--influence of vascular supply on its development. *Neurosurgery* 1992; 31(2):179-85.
- Iwado E, Ichikawa T, Kosaka H, Otsuka S, Kambara H, Tamiya T, Kondo S, Date I. Role of VEGF and matrix metalloproteinase-9 in peritumoral brain edema associated with supratentorial benign meningiomas. *Neuropathology* 2012; 32(6):638-46.
- Jäälinojä J, Herva R, Korpela M, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) immunoreactive protein is associated with poor grade and survival in brain neoplasms. *J Neurooncol* 2000; 46(1):81-90.
- Jaworski DM, Beem-Miller M, Lluri G, Barrantes-Reynolds R. Potential regulatory relationship between the nested gene DDC8 and its host gene tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *Physiological Genomics* 2007; 28:168-178.
- Jaworski DM, Perez-Martinez L. Tissue inhibitor of metalloproteinase- 2 (TIMP-2) expression is regulated by multiple neural differentiation signals. *J Neurochem* 2006; 98(1):234-247
- Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 2000; 218:235-259.
- Jones HC, Richards HK, Bucknall RM, Pickard JD. Local cerebral blood flow in rats with congenital hydrocephalus. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13(3):531-4.

- Jordan GW, Statland B, Halsted C. CSF lactate in diseases of the CNS. *Arch Intern Med* 1983;143(1):85-7.
- Kachra Z, Beaulieu E, Delbecchi L, Mousseau N, Berthelet F, Moumdjian R, Del Maestro R, Béliveau R. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17(7):555-66.
- Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20:495–501.
- Kalala JP, Maes L, Vandebroecke C, de Ridder L. The hTERT protein as a marker for malignancy in meningiomas. *Oncol Rep* 2005; 13(2):273-7.
- Kaldrymidou E, Polizopoulou ZS, Papaioannou N, Koutinas AF, Poutahidis T, Papadopoulos G. Papillary meningioma in the dog: a clinicopathological study of two cases. *J Comp Pathol* 2001; 124(2-3):227-30.
- Kaldrymidou E, Polizopoulou ZS, Papaioannou N, Koutinas AF, Poutahidis T, Papadopoulos G. Papillary meningioma in the dog: a clinicopathological study of two cases. *J Comp Pathol* 2001; 124:227-30.
- Kalkanis SN, Carroll RS, Zhang J, Zamani AA, Black PM. Correlation of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression with peritumoral vasogenic cerebral edema in meningiomas. *J Neurosurg* 1996; 85(6):1095-1101.
- Kawai K, Uetsuka K, Doi K, Nakayama H. The activity of matrix metalloproteinases (MMPS) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats. *J Vet Med Sci* 2006; 68(2):105-111.

- Kawamata H, Uchida D, Hamano H, Kimura-Yanagawa T, Nakashiro KI, Hino S, Omotehara F, Yoshida H, Sato M. Active-MMP2 in cancer cell nests of oral cancer patients: correlation with lymph node metastasis. *Int J Oncol* 1998; 13(4):699-704.
- Kawano N, Osawa H, Ito T, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, Nakatani Y, Kimura S, Kitajima H, Koshikawa N, Miyazaki K, Kitamura H. Expression of gelatinase A, tissue inhibitor of metalloproteinases-2, matrilysin, and trypsin(ogen) in lung neoplasms: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1997; 28(5):613-622.
- Keller ET, Madewell BR. Locations and types of neoplasms in immature dogs: 69 cases (1964-1989). *J Am Vet Med Assoc* 1992; 200(10):1530-2.
- Kempers RD, Miller RH. Management of pregnancy associated with brain tumors. *Am J Obstet Gynecol* 1963; 87:858-864.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141(1):52-67.
- Kido DK, Gomez DG, Pavese AM Jr, Potts DG. Human spinal arachnoid villi and granulations. *Neuroradiology* 1976; 11(5):221-8.
- Kieseier BC, Kiefer R, Clements JM, Miller K, Wells GM, Schweitzer T, Gearing AJ, Hartung HP. Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 1998; 121 ( Pt 1):159-66.
- Kirches E, Grunewald J, von Bossanyi P, Szibor R, Plate I, Krüger S, Warich-Kirches M, Dietzmann K. Expression of matrix metalloproteinases in a series of 12 meningiomas. *Clin Neuropathol* 2001; 20(1):26-3.

- Kitagawa M, Kanayama K, Sakai T. Cerebellopontine angle meningioma expanding into the sella turcica in a dog. *J Vet Med Sci* 2004; 66(1):91-3.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61(3):215-25.
- Koblik PD, LeCouteur RA, Higgins RJ, Bollen AW, Vernau KM, Kortz GD, Ilkiw JE. CT-guided brain biopsy using a modified Pelorus Mark III stereotactic system: experience with 50 dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1999; 40(5):434-40.
- Koestner A, Bilzer T, Fatzer R, Schulman FY, Summers BA, Van Winkle TJ: World Health Organization: Histological Classification of Tumors of the Nervous System of Domestic Animals, pp. 27-29. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1999.
- Kraft SL, Gavin PR, DeHaan C, Moore M, Wendling LR, Leathers CW. Retrospective review of 50 canine intracranial tumors evaluated by magnetic resonance imaging. *J Vet Intern Med* 1997; 11(4):218-25.
- Lamberts SW, Tanghe HL, Avezaat CJ, Braakman R, Wijngaarde R, Koper JW, de Jong H. Mifepristone (RU 486) treatment of meningiomas. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55(6):486-90.
- Lee KJ, Joo WI, Rha HK, Park HK, Chough JK, Hong YK, Park CK. Peritumoral brain edema in meningiomas: correlations between magnetic resonance imaging, angiography, and pathology. *Surg Neurol* 2008; 69(4):350-5.

- Leibman NF, Lana SE, Hansen RA, Powers BE, Fettman MJ, Withrow SJ, Ogilvie GK. Identification of matrix metalloproteinases in canine cutaneous mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 2000; 14(6):583-586.
- Lekanne Deprez RH, Riegman PH, van Drunen E, Warringa UL, Groen NA, Stefanko SZ, Koper JW, Avezaat CJ, Mulder PG, Zwarthoff EC, et al. Cytogenetic, molecular genetic and pathological analyses in 126 meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54(2):224-35.
- Leon R, Wu H, Jin Y, Wei J, Buddhala C, Prentice H, Wu JY. Protective function of taurine in glutamate-induced apoptosis in cultured neurons. *J Neurosci Res* 2009; 87(5):1185-94.
- Leppert D, Leib SL, Grygar C, Miller KM, Schaad UB, Holländer GA. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis* 2000; 31(1):80-4.
- Lieu AS, Howng SL. Intracranial meningiomas and epilepsy: incidence, prognosis and influencing factors. *Epilepsy Res* 2000; 38(1):45-52.
- Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2001; 86(1):324-33.
- Lillehei KO, Donson AM, Kleinschmidt-DeMasters BK. Radiation-induced meningiomas: clinical, cytogenetic, and microarray features. *Acta Neuropathol* 2008; 116(3):289-301.

- Lindblom A, Rutledge M, Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski JP. Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 1994; 56(3):354-7.
- Liu Y, Pang JC, Dong S, Mao B, Poon WS, Ng HK. Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol* 2005; 36(4):416-25.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
- Lobato RD, Alday R, Gómez PA, Rivas JJ, Domínguez J, Cabrera A, Madero S, Ayerbe J. Brain oedema in patients with intracranial meningioma. Correlation between clinical, radiological, and histological factors and the presence and intensity of oedema. *Acta Neurochir (Wien)* 1996; 138(5):485-93.
- Lobetti RG, Pearson J. Magnetic Resonance imaging in the diagnosis of focal granulomatous meningoencephalitis in two dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1996; 37: 424-427.
- Long S, Argyle DJ, Nixon C, Nicholson I, Botteron C, Olby N, Platt S, Smith K, Rutteman GR, Grinwis GC, Nasir L. Telomerase reverse transcriptase (TERT) expression and proliferation in canine brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; 32(6):662-73.
- Lopez DA, Silvers DN, Helwig EB. Cutaneous meningiomas. A clinicopathologic study. *Cancer* 1974; 34:728-744.

- Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Gil-Benso R, Callaghan R, Collado M, Roldan P, Llombart-Bosch A. Association of loss of 1p and alterations of chromosome 14 in meningioma progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 148(2):123-8.
- Louis DN, Ongaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, 200. Meningioma. In: Louis DN (Ed.), *WHO Classification of tumors of the Central Nervous System*. Lyon, France: IARC Press; 2007: 164-172.
- Loukopoulos P, Mungall BA, Straw RC, Thornton JR, Robinson WF. Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet Pathol* 2003; 40(4):382-394.
- Lusis EA, Chicoine MR, Perry A. High throughput screening of meningioma biomarkers using a tissue microarray. *J Neurooncol* 2005; 73(3):219-23.
- Lusis EA, Watson MA, Chicoine MR, Lyman M, Roerig P, Reifenberger G, Gutmann DH, Perry A. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res* 2005; 65(16):7121-6.
- Machein MR, Plate KH. VEGF in brain tumors. *J Neurooncol* 2000; 50(1-2):109-120.
- Maes L, Kalala JP, Cornelissen M, de Ridder L. Progression of astrocytomas and meningiomas: an evaluation in vitro. *Cell Prolif* 2007; 40(1):14-23.
- Maes L, Kalala JP, Cornelissen R, de Ridder L. Telomerase activity and hTERT protein expression in meningiomas: an analysis in vivo versus in vitro. *Anticancer Res* 2006; 26(3B):2295-2300.

- Maes L, Lippens E, Kalala JP, de Ridder L. The hTERT-protein and Ki-67 labelling index in recurrent and non-recurrent meningiomas. *Cell Prolif* 2005; 38(1):3-12.
- Maes RK, Langohr IM, Wise AG, Smedley RC, Thaiwong T, Kiupel M. Beyond H&E: integration of nucleic acid-based analyses into diagnostic pathology. *Vet Pathol* 2014; 51(1):238-56.
- Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H. Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *J Neurosurg* 1992; 77(4):616-23.
- Maiuri F, Gangemi M, Cirillo S, Delehaye L, Gallicchio B, Carandente M, Giamundo A. Cerebral edema associated with meningiomas. *Surg Neurol* 1987; 27(1):64-8.
- Maiuri F, Iaconetta G, de Divitiis O, Cirillo S, Di Salle F, De Caro ML. Intracranial meningiomas: correlations between MR imaging and histology. *Eur J Radiol* 1999; 31(1):69-75.
- Mandara MT, Pavone S, Brunetti B, Mandrioli L. A comparative study of canine and feline meningioma classification based on WHO histological classification system in humans. 22nd Annual Symposium of the European Society of Veterinary Neurology (ESVN). Neuro-oncology, Bologna (BO), 24-26 September 2009. In: Proceedings 22nd ESVNECVN Annual Symposium 2009, pp. 103 - 104. Proceedings published in supplement of *Journal of Veterinary Internal Medicine*. vol.24 issue 1, Jan-Feb 2010.
- Mandara MT, Pavone S, Mandrioli L, Bettini G, Falzone C, Baroni M. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in canine and feline meningioma. *Vet Pathol* 2009; 46(5):836-45.

- Mandara MT, Ricci G, Rinaldi L, Sarli G, Vitellozzi G. Immunohistochemical identification and image analysis quantification of oestrogen and progesterone receptors in canine and feline meningioma. *J Comp Pathol* 2002; 127(2-3):214-8.
- Mandrioli L, Brunetti B, Sarli G, Mandara MT. Espressione immunoistochimica di caderina-E e beta-catenina nel meningioma del cane, «VETERINARIA», 2011; 25: 23-29.
- Mandrioli L, Panarese S, Cesari A, Mandara MT, Marcato PS, Bettini G. Immunohistochemical expression of h-telomerase reverse transcriptase in canine and feline meningiomas. *J Vet Sci* 2007; 8(2):111-5.
- Marchenko GN, Marchenko ND, Strongin AY. The structure and regulation of the human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein. *Biochem J* 2003; 372(Pt 2):503-15.
- Marinkovich MP. Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:370–380.
- Marosi C, Hassler M, Ssler KR. Guidelines to the treatment of meningioma. *Forum (Genova)* 2003; 13(1):76-89.
- Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, Nakamura S, Baba S, Moriya Y, Hirohashi S. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 2000; 59(4):302-9.
- Matiasek LA, Platt SR, Adams V, Scase TJ, Keys D, Miller J, Adamo F, Long S, Matiasek K. Ki-67 and vascular endothelial growth factor expression in intracranial meningiomas in dogs. *J Vet Intern Med* 2009; 23(1):146-51.

- Matsuda Y, Kawamoto K, Kiya K, Kurisu K, Sugiyama K, Uozumi T. Antitumor effects of antiprogestones on human meningioma cells in vitro and in vivo. *J Neurosurg* 1994; 80(3):527-34.
- Mawrin C, Sasse T, Kirches E, Kropf S, Schneider T, Grimm C, Pambor C, Vorwerk CK, Firsching R, Lendeckel U, Dietzmann K. Different activation of mitogen-activated protein kinase and Akt signaling is associated with aggressive phenotype of human meningiomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11(11):4074-82.
- McDermott MW, Wilson CB. Meningiomas. In: Youmans JR, ed. *Neurological surgery*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: W B Saunders Company; 1996: 2782-2825.
- Mealey J Jr, Carter JE. Spinal cord tumor during pregnancy. *Obstet Gynecol* 1968; 32(2):204-209.
- Mercier M, Heller HL, Bischoff MG, Looper J, Bacmeister CX. Imaging diagnosis--hyperostosis associated with meningioma in a dog. *Vet Radiol Ultrasound* 2007; 48(5):421-3.
- Merzak A, Koocheckpour S, Pilkington GJ. CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Res* 1994; 54(15):3988-92.
- Meuten DJ: *Tumors in Domestic Animals*. Ed. Iowa State Press, State Avenue, Ames, Iowa. 4th Edition, 2002.
- Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol* 2000; 18:2626–2634.

- Miao Q, Baumgärtner W, Failing K, Alldinger S. Phase-dependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathol* 2003; 106(5):486-494.
- Mizoue T, Kawamoto H, Arita K, Tominaga A, Kurisu K. Secretion of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by meningiomas detected by cell immunoblot analysis. *Acta Neurochir (Wien)* 1999; 141(5):481-6.
- Montoliu P, Añor S, Vidal E, Pumarola M. Histological and immunohistochemical study of 30 cases of canine meningioma. *J Comp Pathol* 2006; 135:200-7.
- Moon HS, Jung S, Jung TY, Cao VT, Moon KS, Kim IY: Possible role of matrix metalloproteinase in osteolytic intracranial meningiomas. *J Korean Neurosurg Soc* 2010; 47(1):11-16.
- Moore CS, Crocker SJ. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *Am J Pathol* 2012; 180(1):12-6.
- Morantz RA, Walsh JW. *Brain Tumors: A Comprehensive Text*. New York: Marcel Dekker; 1994.
- Morrison CJ, Butler GS, Bigg HF, Roberts CR, Soloway PD, Overall CM. Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J Biol Chem* 2001; 276(50):47402-10.
- Motta L, Mandara MT, Skerritt GC. Canine and feline intracranial meningiomas: an updated review. *Vet J* 2012; 192(2):153-65.
- Motta L, Michal Altay U, Kelly D, Skerritt CG. Intracranial germ cell tumor in an Airedale Terrier. *European Journal of Companion Animal Practice* 2011; 21: 179-183.

Murakami M, Sakai H, Kodama A, Yanai T, Mori T, Maruo K, Masegi T. Activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane type 1-MMP and abnormal immunolocalization of the basement membrane components laminin and type IV collagen in canine spontaneous hemangiosarcomas. *Histol Histopathol* 2009; 24(4):437-446.

Murate T, Yamashita K, Ohashi H, Kagami Y, Tsushita K, Kinoshita T, Hotta T, Saito H, Yoshida S, Mori KJ et al. Erythroid potentiating activity of tissue inhibitor of metalloproteinases on the differentiation of erythropoietin-responsive mouse erythroleukemia cell line, ELM-I-1-3, is closely related to its cell growth potentiating activity. *Exp Hematol* 1993; 21(1):169–176.

Nagaishi M, Nobusawa S, Tanaka Y, Ikota H, Yokoo H, Nakazato Y. Slug, twist, and E-cadherin as immunohistochemical biomarkers in meningeal tumors. *PLoS One*. 2012; 7:e46053.

Nagashima G, Fujimoto T, Suzuki R, Asai J, Itokawa H, Noda M: Dural invasion of meningioma: a histological and immunohistochemical study. *Brain Tumor Pathol* 2006; 23(1):13-17.

Nagel H, Laskawi R, Wahlers A, Hemmerlein B. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and -3 in benign and malignant tumours of the salivary gland. *Histopathology* 2004; 44(3):222-31.

Nägele T, Petersen D, Klose U, Grodd W, Opitz H, Voigt K. The "dural tail" adjacent to meningiomas studied by dynamic contrast-enhanced MRI: a comparison with histopathology. *Neuroradiology* 1994; 36(4):303-7.

- Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kawano H, Hayakawa T, Okada Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. *J Neurosurg* 1994; 81(1):69-77
- Nakaichi M, Yunuki T, Okuda M, Une S, Taura Y. Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors. *Res Vet Sci* 2007; 82(2):271-279.
- Nakaichi M, Yunuki T, Okuda M, Une S, Taura Y. Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors. *Res Vet Sci* 2007; 82(2):271-9.
- Nasir L, Devlin P, Mckevitt T, Rutteman G, Argyle DJ. Telomere lengths and telomerase activity in dog tissues: a potential model system to study human telomere and telomerase biology. *Neoplasia* 2001; 3(4):351-9.
- Nassehi D, Dyrbye H, Andresen M, Thomsen C, Juhler M, Laursen H, Broholm H. Vascular endothelial growth factor A protein level and gene expression in intracranial meningiomas with brain edema. *APMIS* 2011; 119(12):831-43.
- Nassehi D, Sørensen LP, Dyrbye H, Thomsen C, Juhler M, Laursen H, Broholm H. Peritumoral brain edema in angiomatous supratentorial meningiomas: an investigation of the vascular endothelial growth factor A pathway. *APMIS* 2013; 121(11):1025-36.
- Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22:287-309.
- NG HK, Wong AT. Expression of epithelial and extracellular matrix protein markers in meningiomas. *Histopathology* 1993; 22(2):113-25.

Nie J, Pei D. Direct activation of pro-matrix metalloproteinase-2 by leukolysin/membrane-type 6 matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase 25 at the asn(109)-Tyr bond. *Cancer Res* 2003; 63(20):6758-62.

Nordqvist AC, Smurawa H, Mathiesen T. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in meningiomas associated with different degrees of brain invasiveness and edema. *J Neurosurg* 2001; 95:839–844.

O'Brien DP, Axlund TW. Brain Disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. St. Louise: Elsevier. 2005: 830-833.

Oakley RE, Patterson JS. Tumors of the central and peripheral nervous system. In: Slatter D, ed. *Textbook of small animal surgery*. Philadelphia:Elsevier Science; 2003: 2405-2425.

Ogura E, Senzaki H, Kiyozuka Y. Expression and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases as a prognostic factor in advanced colorectal carcinomas. *Oncol Rep* 1997; 4: 701-705.

Okada M, Miyake K, Matsumoto Y, Kawai N, Kunishio K, Nagao S. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with the recurrence of intracranial meningiomas. *J Neurooncol*. 2004 Jan;66(1-2):29-37.

Onisto M, Riccio MP, Scannapieco P, Caenazzo C, Griggio L, Spina M, Stetler-Stevenson WG, Garbisa S. Gelatinase A/TIMP-2 imbalance in lymph-node-positive breast carcinomas, as measured by RT-PCR. *Int J Cancer* 1995; 63(5):621-6.

- Opitz L, Salinas-Riester G, Grade M, Jung K, Jo P, Emons G, Ghadimi BM, Beissbarth T, Gaedcke J. Impact of RNA degradation on gene expression profiling. *BMC Med Genomics* 2010; 3:36.
- Otsuka S, Tamiya T, Ono Y, Michiue H, Kurozumi K, Daido S, Kambara H, Date I, Ohmoto T. The relationship between peritumoral brain edema and the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in intracranial meningiomas. *J Neurooncol* 2004; 70(3):349-57.
- Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metallo-proteinase substrate binding domains, modules, and exosites, *Mol Biotechnol* 2002; 22(1):51–86.
- Owen CA, Hu Z, Lopez-Otin C, Shapiro SD. Membrane-bound matrix metalloproteinase-8 on activated polymorphonuclear cells is a potent, tissue inhibitor of metalloproteinase-resistant collagenase and serpinase. *J Immunol* 2004; 172(12):7791-803.
- Owen MC, Lamb CR, Lu D, Targett MP. Material in the middle ear of dogs having magnetic resonance imaging for investigation of neurologic signs. *Vet Radiol Ultrasound* 2004; 45(2):149-55.
- Ozaki S, Nishizaki T, Ito H, Sasaki K. Comparative genomic hybridization analysis of genetic alterations associated with malignant progression of meningioma. *J Neurooncol* 1999; 41(2):167-74.
- Paek SH, Kim CY, Kim YY, Park IA, Kim MS, Kim DG, Jung HW. Correlation of clinical and biological parameters with peritumoral edema in meningioma. *J Neurooncol* 2002; 60(3):235-245.

- Paek SH, Kim DG, Park CK, Phi JH, Kim YY, Im SY, Kim JE, Park SH, Jung HW. The role of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in microcystic meningiomas. *Oncol Rep* 2006; 16(1):49-56.
- Palma L, Celli P, Franco C, Cervoni L, Cantore G. Long-term prognosis for atypical and malignant meningiomas: a study of 71 surgical cases. *J Neurosurg* 1997; 86(5):793-800.
- Panagopoulos AT, Lancellotti CL, Veiga JC, de Aguiar PH, Colquhoun A. Expression of cell adhesion proteins and proteins related to angiogenesis and fatty acid metabolism in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *J Neurooncol* 2008; 89(1):73-87.
- Patnaik AK, Kay WJ, Hurvitz AI. Intracranial meningioma: a comparative pathologic study of 28 dogs. *Vet Pathol* 1986; 23(4):369-73.
- Patnaik AK, Lieberman PH, Erlandson RA, Shaker E, Hurvitz AI: Paranasal meningioma in the dog: a clinicopathologic study of ten cases. *Vet Pathol* 1986; 23(4):362-368.
- Patterson ML, Atkinson SJ, Knäuper V, Murphy G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett* 2001; 503(2-3):158-62.
- Pecina-Slaus N, Cicvara-Pecina T, Kafka A. Epithelial-to-mesenchymal transition: possible role in meningiomas *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; 4:889-96.
- Pećina-Slaus N, Nikuseva Martić T, Deak AJ, Zeljko M, Hrasćan R, Tomas D, Musani V. Genetic and protein changes of E-cadherin in meningiomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136(5):695-702.

- Pei J, Jung S, Jin SG, Moon KS, Wen M, Li SY, Jang WY, Ryu HH, Lee KH, Kim IY, Jung TY. Possible role of matrix metalloproteinases (MMPs) in hyperostosis of intracranial meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 2012; 154(4):611-20.
- Pérez V, Vidal E, González N, Benavides J, Ferreras MC, Villagrasa M, Pumarola M. Orbital meningioma with a granular cell component in a dog, with extracranial metastasis. *J Comp Pathol* 2005; 133(2-3):212-7.
- Pérez-Magán E, Campos-Martín Y, Mur P, Fiaño C, Ribalta T, García JF, Rey JA, Rodríguez de Lope A, Mollejo M, Meléndez B. Genetic alterations associated with progression and recurrence in meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71(10):882-93.
- Perez-Martinez L, Jaworski DM. Tissue inhibitor of metalloproteinase- 2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal. *J Neurosci* 2005; 25(20):4917–4929.
- Perret AG, Duthel R, Fotso MJ, Brunon J, Mosnier JF. Stromelysin-3 is expressed by aggressive meningiomas. *Cancer* 2002; 94:765–772.
- Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G. Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol* 2004; 70(2):183-202.
- Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC. "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer* 1999; 85(9):2046-56.
- Petersen SA, Sturges BK, Dickinson PJ, Pollard RE, Kass PH, Kent M, Vernau KM, Lecouteur RA, Higgins RJ. Canine intraspinal meningiomas: imaging features,

- histopathologic classification, and long-term outcome in 34 dogs. *J Vet Intern Med* 2008; 22(4):946-53.
- Pfisterer WK, Coons SW, Aboul-Enein F, Hendricks WP, Scheck AC, Preul MC. Implicating chromosomal aberrations with meningioma growth and recurrence: results from FISH and MIB-I analysis of grades I and II meningioma tissue. *J Neurooncol* 2008; 87(1):43-50.
- Pfisterer WK, Hank NC, Preul MC, Hendricks WP, Puschel J, Coons SW, Scheck AC. Diagnostic and prognostic significance of genetic regional heterogeneity in meningiomas. *Neuro Oncol* 2004; 6(4):290-9.
- Philippon J, Foncin JF, Grob R, Srour A, Poisson M, Pertuiset BF. Cerebral edema associated with meningiomas: possible role of a secretory-excretory phenomenon. *Neurosurgery* 1984; 14(3):295-301.
- Picker LJ, Nakache M, Butcher EC. Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J Cell Biol* 1989; 109(2):927-37.
- Pinna G, Beltramello A, Buffatti P, Signorini G, Colombari R, Bricolo A, Dalle Ore G. Cystic meningiomas--an update. *Surg Neurol* 1986; 26(5):441-52.
- Pistoiesi S, Fontanini G, Camacci T, De Ieso K, Boldrini L, Lupi G, Padolecchia R, Pingitore R, Parenti G. Meningioma-associated brain oedema: the role of angiogenic factors and pial blood supply. *J Neurooncol* 2002; 60(2):159-64.

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143–147.
- Platt SR, Scase TJ, Adams V, Wieczorek L, Miller J, Adamo F, Long S. Vascular endothelial growth factor expression in canine intracranial meningiomas and association with patient survival. *J Vet Intern Med* 2006; 20(3):663-668.
- Pohar N, Godenschwege TA, Buchner E. Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: Structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human. *Genomics* 1999; 57:293–296.
- Polizopoulou ZS, Koutinas AF, Souftas VD, Kaldrymidou E, Kazakos G, Papadopoulos G. Diagnostic correlation of CT-MRI and histopathology in 10 dogs with brain neoplasms. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2004; 51(5):226-31.
- Pollard RE, Reilly CM, Uerling MR, Wood FD, Feldman EC. Cross-sectional imaging characteristics of pituitary adenomas, invasive adenomas and adenocarcinomas in dogs: 33 cases (1988-2006). *J Vet Intern Med* 2010; 24(1):160-5.
- Poremba C, Scheel C, Hero B, Christiansen H, Schaefer KL, Nakayama Ji, Berthold F, Juergens H, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B Poremba C, Scheel C, Hero B, Christiansen H, Schaefer KL, Nakayama Ji, Berthold F, Juergens H, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B. Telomerase activity and telomerase subunits gene expression patterns in neuroblastoma: a molecular and immunohistochemical study establishing prognostic tools from fresh-frozen and paraffin-embedded tissues. *J Clin Oncol* 2000; 17: 2582–2592.

- Provias J, Claffey K, delAguila L, Lau N, Feldkamp M, Guha A. Meningiomas: role of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in angiogenesis and peritumoral edema. *Neurosurgery* 1997; 40(5):1016-1026.
- Ramaswamy S. Translating cancer genomics into clinical oncology. *N Engl J Med* 2004; 29;350(18):1814-6.
- Ramos-Vara JA, Miller MA, Gilbreath E, Patterson JS. Immunohistochemical Detection of CD34, E-cadherin, Claudin-1, Glucose Transporter 1, Laminin, and Protein Gene Product 9.5 in 28 Canine and 8 Feline Meningiomas *Vet Pathol* 2010; 47: 725-737.
- Regelsberger J, Hagel C, Emami P, Ries T, Heese O, Westphal M. Secretory meningiomas: a benign subgroup causing life-threatening complications. *Neuro Oncol* 2009; 11(6):819-24.
- Rempel SA, Schwechheimer K, Davis RL, Cavenee WK, Rosenblum ML. Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res* 1993; 53(10 Suppl):2386-92.
- Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol* 2006; 5(12):1045-54.
- Ries C. Cytokine function of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(4) 659-672.
- Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 5):853-65.
- Rokni-Yazdi H, Sotoudeh H. Prevalence of "dural tail sign" in patients with different intracranial pathologies. *Eur J Radiol* 2006; 60(1):42-5.

- Rooprai HK, van Meter TE, Robinson SD, King A, Rucklidge GJ, Pilkington GJ. Expression of MMP-2 and -9 in short-term cultures of meningioma: influence of histological subtype. *Int J Mol Med* 2003; 12(6):977-981.
- Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:5287–5297.
- Rudy W, Hofmann M, Schwartz-Albiez R, Zöller M, Heider KH, Ponta H, Herrlich P. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res* 1993; 53(6):1262-8.
- Ruggieri M, Polizzi A, Nucifora C, Magro G. *Neuroembriologia in Neurologia Pediatrica*. Pavone L, Ruggieri M. 2006: pp. 48-63.
- Rushing EJ, Colvin SM, Gazdar A, Miura N, White CL 3rd, Coimbra C, Burns DK. Prognostic value of proliferation index and expression of the RNA component of human telomerase (hTR) in papillary meningiomas. *J Neurooncol*. 45(3):199-207, 1999.
- Rushing EJ, Colvin SM, Gazdar A, Miura N, White CL 3rd, Coimbra C, Burns DK. Prognostic value of proliferation index and expression of the RNA component of human telomerase (hTR) in papillary meningiomas. *J Neurooncol*. 45(3):199-207, 1999.
- Ruttledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjöld M, Collins VP, et al. Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet*. 1994 Feb;6(2):180-4.

Ruttledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski JP. Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994 Jun;10(2):122-30.

Saika S, Kawashima Y, Okada Y, Tanaka SI, Yamanaka O, Ohnishi Y, Ooshima A. Recombinant TIMP-1 and -2 enhance the proliferation of rabbit corneal epithelial cells in vitro and the spreading of rabbit corneal epithelium in situ. *Curr Eye Res* 1998; 17(1):47–52.

Sakamoto A, Oda Y, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in human cartilaginous tumors with special emphasis on mesenchymal and dedifferentiated chondrosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 125(10):541-548, 1999.

Sakamoto S, Kyprianou N. Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis. *Mol Aspects Med*. 2010 Apr;31(2):205-14.

Sakuma T, Nakagawa T, Ido K, Takeuchi H, Sato K, Kubota T. Expression of vascular endothelial growth factor-A and mRNA stability factor HuR in human meningiomas. *J Neurooncol*. 2008 Jun;88(2):143-55.

Sakuma Y, Takeuchi T, Nakamura Y, Yoshihara M, Matsukuma S, Nakayama H, et al. Lung adenocarcinoma cells floating in lymphatic vessels resist anoikis by expressing phosphorylated Src. *J Pathol* 2010; 220:574–585.

Salpietro FM, Alafaci C, Lucerna S, Iacopino DG, Todaro C, Tomasello F. Peritumoral edema in meningiomas: microsurgical observations of different brain tumor interfaces related to computed tomography. *Neurosurgery* 1994; 35(4):638-41.

- Salvadori C, Pintore MD, Ricci E, Konar M, Tartarelli CL, Gasparinetti N, Cantile C. Microcystic meningioma of the fourth ventricle in a dog. *J Vet Med Sci* 2011; 73(3):367-70.
- Samoto K, Ikezaki K, Ono M, Shono T, Kohno K, Kuwano M, Fukui M. Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* 1995; 55(5):1189-93.
- Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, Bruton R, Marsden JR, Jankowski J. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol*. 1999 Jun;52(3):151-7.
- Sandig M, Voura EB, Kalnins VI, Siu CH. Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997; 38(4):351-64.
- Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 2008; 32(2):200-19.
- Sanson M, Cornu P: Biology of meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 2000; 142(5):493-505.
- Sasaki T, Hankins GR, Helm GA. Comparison of gene expression profiles between frozen original meningiomas and primary cultures of the meningiomas by GeneChip. *Neurosurgery* 2003; 52(4):892-8.
- Sayagués JM, Taberero MD, Maíllo A, Trelles O, Espinosa AB, Sarasquete ME, Merino M, Rasillo A, Vera JF, Santos-Briz A, de Alava E, Garcia-Macias MC, Orfao A. Microarray-based analysis of spinal versus intracranial meningiomas: different

- clinical, biological, and genetic characteristics associated with distinct patterns of gene expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65(5):445-54.
- Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* 2010; 339:237–246.
- Scheidegger P, Weiglhofer W, Suarez S, Kaser-Hotz B, Steiner R, Ballmer-Hofer K, Jaussi R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in tumor-bearing dogs. *Biol Chem* 1999; 380(12):1449-54.
- Scherf DB, Dally H, Müller P, Werle-Schneider G, Jäger B, Edler L, Tuengerthal S, Fischer JR, Drings P, Bartsch H, Risch A. Single nucleotide polymorphisms in matrix metalloproteinase genes and lung cancer chemotherapy response and prognosis. *Eur Respir J* 2010; 35(2):381-90.
- Schiffer D, Ghimenti C, Fiano V. Absence of histological signs of tumor progression in recurrences of completely resected meningiomas. *J Neurooncol* 2005; 73(2):125-30.
- Schmid S, Aboul-Enein F, Pfisterer W, Birkner T, Stadek C, Knosp E. Vascular endothelial growth factor: the major factor for tumor neovascularization and edema formation in meningioma patients. *Neurosurgery* 2010; 67(6):1703-8.
- Schulman FY, Carpenter JL, Ribas JL, Brum DE. Cystic papillary meningioma in the sella turcica of a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 200:67-9.
- Schulman FY, Ribas JL, Carpenter JL, Sisson AF, LeCouteur RA. Intracranial meningioma with pulmonary metastasis in three dogs. *Vet Pathol* 1992; 29(3):196-202.
- Schulman FY, Ribas JL, Carpenter JL, Sisson AF, LeCouteur RA. Intracranial meningioma with pulmonary metastasis in three dogs. *Vet Pathol* 1992; 29(3):196-202.

- Schwechheimer K, Zhou L, Birchmeier W. E-Cadherin in human brain tumours: loss of immunoreactivity in malignant meningiomas. *Virchows Arch* 1998; 432(2):163-167.
- Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(24):12160-4.
- Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990; 50(6):1774-8.
- Serna E, Morales JM, Mata M, Gonzalez-Darder J, San Miguel T, Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Monleon D. Gene expression profiles of metabolic aggressiveness and tumor recurrence in benign meningioma. *PLoS One*. 2013; 8(6):e67291.
- Sessums K, Mariani C. Intracranial meningioma in dogs and cats: a comparative review. *Compend Contin Educ Vet* 2009; 31(7):330-9.
- Shimada S, Ishizawa K, Hirose T. Expression of E-cadherin and catenins in meningioma: ubiquitous expression and its irrelevance to malignancy. *Pathol Int* 2005; 55:1-7.
- Shiomi T, Okada Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22(2-3):145-52.
- Siddique K, Yanamandra N, Gujrati M, Dinh D, Rao JS, Olivero W. Expression of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and urokinase plasminogen activator in human meningiomas. *Int J Oncol* 2003; 22(2):289-9.

- Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM Jr, Menon AG. Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 1995; 55(20):4696-701.
- Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation* 2010; 121(8):1022-32.
- Smith HP, Challa VR, Moody DM, Kelly DL Jr. Biological features of meningiomas that determine the production of cerebral edema. *Neurosurgery* 1981; 8(4):428-33.
- Snyder JM, Shofer FS, Van Winkle TJ, Massicotte C. Canine Intracranial Primary Neoplasia: 173 Cases (1986-2003). *J Vet Intern Med* 2006; 20(3):669-675.
- Song RB, Vite CH, Bradley CW, Cross JR. Postmortem evaluation of 435 cases of intracranial neoplasia in dogs and relationship of neoplasm with breed, age, and body weight. *J Vet Intern Med* 2013; 27(5):1143-52.
- Speciale J, Koffman BM, Bashirelahi N, Steinberg SA. Identification of gonadal steroid receptors in meningiomas from dogs and cats. *Am J Vet Res* 1990; 51(5):833-5.
- Srivastava P, Mandhani A, Kapoor R, Mittal RD. Role of MMP-3 and MMP-9 and their haplotypes in risk of bladder cancer in North Indian cohort. *Ann Surg Oncol* 2010; 17(11):3068-75.
- Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003; 200:448-464.

- Stearns M, Stearns ME. Evidence for increased activated metalloproteinase 2 (MMP-2a) expression associated with human prostate cancer progression. *Oncol Res* 1996 8(2):69-75.
- Stetler Stevenson WG, Bersch N, Golde DW. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid- potentiating activity. *FEBS Lett* 1992; 296:231–234.
- Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, Fukushima P, Kehrl J, Marti G, Ptaszynski K, Wang J, Stetler-Stevenson WG. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood* 1997; 89(5):1708–1715.
- Stetler-Stevenson WG, Seo DW. TIMP-2: an endogenous inhibitor of angiogenesis. *Trends Mol Med* 2005; 11(3):97–103.
- Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: A moving target for therapeutic intervention. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 103:1237–1241.
- Stetler-Stevenson WG. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27(1):57-66.
- Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 2008; 1(27):re6.
- Sturges BK, Dickinson PJ, Bollen AW, Koblik PD, Kass PH, Kortz GD, Vernau KM, Knipe MF, Lecouteur RA, Higgins RJ. Magnetic resonance imaging and histological classification of intracranial meningiomas in 112 dogs. *J Vet Intern Med* 2008; 22(3):586-95.

- Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC, Laug WE, DeClerck YA. Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res* 1998; 58(10):2209-2216.
- Sullivan LA, Campbell VL, Klopp LS, Rao S. Blood lactate concentrations in anesthetized dogs with intracranial disease. *J Vet Intern Med* 2009; 23(3):488-92.
- Summers BA, Cummings JF, and DeLahunta A. *Veterinary Neuropathology*. St. Louis, Missouri: Mosby; 1995:351-401.
- Suzuki H, Gilbert EF, Zimmermann B. Primary extracranial meningioma. *Arch Pathol* 1967; 84:202-206.
- Suzuki Y, Sugimoto T, Shibuya M, Sugita K, Patel SJ. Meningiomas: correlation between MRI characteristics and operative findings including consistency. *Acta Neurochir (Wien)* 1994; 129(1-2):39-46.
- Tamiya T, Ono Y, Matsumoto K, Ohmoto T. Peritumoral brain edema in intracranial meningiomas: effects of radiological and histological factors. *Neurosurgery* 2001; 49(5):1046-51.
- Tamura S, Tamura Y, Nakamoto Y, Ozawa T, Uchida K. MR imaging of histiocytic sarcoma of the canine brain. *Vet Radiol Ultrasound* 2009; 50(2):178-81.
- Tanaka M, Imhof HG, Schucknecht B, Kollias S, Yonekawa Y, Valavanis A. Correlation between the efferent venous drainage of the tumor and peritumoral edema in intracranial meningiomas: superselective angiographic analysis of 25 cases. *J Neurosurg* 2006; 104(3):382-8.

- Tews DS, Fleissner C, Tiziani B, Gaumann AK. Intrinsic expression of drug resistance-associated factors in meningiomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2001; 9(3):242-9.
- Théon AP, Lecouteur RA, Carr EA, Griffey SM. Influence of tumor cell proliferation and sex-hormone receptors on effectiveness of radiation therapy for dogs with incompletely resected meningiomas. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216(5):701-7.
- Thomas R, Duke SE, Wang HJ, Breen TE, Higgins RJ, Linder KE, Ellis P, Langford CF, Dickinson PJ, Olby NJ, Breen M. 'Putting our heads together': insights into genomic conservation between human and canine intracranial tumors. *J Neurooncol* 2009;94(3):333-49
- Thomas W, Wheeler S, Kramer R. Magnetic resonance imaging feature of primary brain tumors in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1996; 37:20–27.
- Thomovsky SA, Packer RA, Burcham GN, Heng HG. Imaging diagnosis-magnetic resonance imaging features of metastatic cerebral lymphoma in a dog. *Vet Radiol Ultrasound* 2011; 52(2):192-5.
- Thomson SA, Kennerly E, Olby N, Mickelson JR, Hoffmann DE, Dickinson PJ, Gibson G, Breen M. Microarray analysis of differentially expressed genes of primary tumors in the canine central nervous system *Vet Pathol* 2005; 42(5):550-8.
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ, Schalken JA. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 2000; 60(13):3650-4.

- Troxel MT, Vite CH, Massicotte C, McLear RC, Van Winkle TJ, Glass EN, Tiches D, Dayrell-Hart B. Magnetic resonance imaging features of feline intracranial neoplasia: retrospective analysis of 46 cats. *J Vet Intern Med* 2004; 18(2):176-89.
- Tummalapalli P, Spomar D, Gondi CS, Olivero WC, Gujrati M, Dinh DH, Rao JS. RNAi-mediated abrogation of cathepsin B and MMP-9 gene expression in a malignant meningioma cell line leads to decreased tumor growth, invasion and angiogenesis. *Int J Oncol* 2007; 31(5):1039-50.
- Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* 2001; 439(6):725-51.
- Vignes JR, Sesay M, Rezajooi K, Gimbert E, Liguoro D. Peritumoral edema and prognosis in intracranial meningioma surgery. *J Clin Neurosci* 2008; 15(7):764-8.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92(8):827–839.
- Von Randow AJ, Schindler S, Tews DS. Expression of extracellular matrix-degrading proteins in classic, atypical, and anaplastic meningiomas. *Pathol Res Pract* 2006; 202(5):365-72.
- Walker RA, Woolley DE. Immunolocalisation studies of matrix metalloproteinases-1, -2 and -3 in human melanoma. *Virchows Arch* 1999; 435(6):574-579.
- Wall M, Platt S, Selcer B, Brockus C, Howerth E. Multifocal spinal papillary meningioma in a dog. *Vet Radiol Ultrasound* 2005; 46:309-12.

- Wang DJ, Xie Q, Gong Y, Wang Y, Cheng HX, Mao Y, Zhong P, Huang FP, Zheng K, Wang YF, Bao WM, Yang BJ, Chen H, Xie LQ, Zheng MZ, Tang HL, Zhu HD, Chen XC, Zhou LF. Secretory meningiomas: clinical, radiological and pathological findings in 70 consecutive cases at one institution. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(3):358-74.
- Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:26411–26415.
- Waterman EA, Sakai N, Nguyen NT, Horst BA, Veitch DP, Dey CN, et al. A laminin/collagen complex drives human epidermal carcinogenesis through phosphoinositol-3-kinase activation. *Cancer Res* 2007; 67:4264–4270.
- Watson MA, Gutmann DH, Peterson K, Chicoine MR, Kleinschmidt-DeMasters BK, Brown HG, Perry A. Molecular characterization of human meningiomas by gene expression profiling using high-density oligonucleotide microarrays. *Am J Pathol* 2002; 161(2):665-72.
- Watson MA, Scott MG. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1995; 41(3):343-60.
- Webb AA, Muir GD. The blood-brain barrier and its role in inflammation. *J Vet Intern Med* 2000; 14(4):399-411.
- Weber RG, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter P. Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(26):14719-24.

- Welgus HG, Stricklin GP, Eisen AZ, Bauer EA, Cooney RV, Jeffrey JJ. A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 1979; 254(6):1938-1943.
- Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 1995; 146(4):827-32.
- Willis M, Stiles J, Martin C, Mahaffey M. What is your diagnosis? Retrobulbar meningioma in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210(2):177-8.
- Wisner ER, Dickinson PJ, Higgins RJ. Magnetic resonance imaging features of canine intracranial neoplasia. *Vet Radiol Ultrasound* 2011; 52(1 Suppl 1):S52-61.
- Withrow SJ, Vail DM. Tumors of the nervous system. In: *Small Animal Oncology*, 4<sup>th</sup> ed. Elsevier: Saunders 2007: 659-685.
- Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, Neben K, Hahn M, Reifenberger G, Lichter P. Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int J Cancer* 2005; 114(2):249-56.
- Yan W, Zhang W, Sun L, Liu Y, You G, Wang Y, Kang C, You Y, Jiang T. Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme. *Brain Res* 2011; 1411:108-15.
- Yang J, Price MA, Li GY, Bar-Eli M, Salgia R, Jagadeeswaran R, et al. Melanoma proteoglycan modifies gene expression to stimulate tumor cell motility, growth, and epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2009; 69:7538–7547.

- Yazawa M, Okuda M, Setoguchi A, Nishamura R, Sasaki N, Hasegawa A, Toshihiro W, Tsujimoto H Yazawa M, Okuda M, Setoguchi A, Nishamura R, Sasaki N, Hasegawa A, Toshihiro W, Tsujimoto H. Measurement of telomerase activity in dog tumours. *J Vet Med Sci* 1999; 61(10):1125–1129.
- Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Yanoma S, Noguchi Y. Prognostic value of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients with gastric cancer. *Cancer Lett* 2000; 151(1):81-86.
- Yoshioka H, Hama S, Taniguchi E, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K. Peritumoral brain edema associated with meningioma: influence of vascular endothelial growth factor expression and vascular blood supply. *Cancer* 1999; 85(4):936-44.
- Zaki FA, Prata RG, Hurvitz AI, Kay WJ. Primary tumors of the spinal cord and meninges in six dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1975; 166(5):511-7.
- Zaki FA. Spontaneous central nervous system tumors in the dog. *Vet Clin North Am* 1977; 7(1):153-63.
- Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1999; 20(5):749-55.
- Zhou K, Wang G, Wang Y, Jin H, Yang S, Liu C. The potential involvement of E-cadherin and beta-catenins in meningioma. *PLoS One* 2010; 5:e11231.
- Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez-Otin C. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Curr Top Dev Biol* 2003; 54:1-74.