

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SANITÁ PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA
E IGIENE VETERINARIA

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE
INDIRIZZO DI SANITÁ PUBBLICA E PATOLOGIA COMPARATA
XXIII CICLO



ASPETTI CLASSIFICATIVI, EPIDEMIOLOGICI, PROGNOSTICI E PROFILI DI ESPRESSIONE PROTEICA DEL TUMORE MAMMARIO DEL CANE

DIRETTORE DELLA SCUOLA: CH.MO PROF. MASSIMO MORGANTE

COORDINATORE DI INDIRIZZO: CH.MO PROF. MAURO DACASTO

SUPERVISORE: CH.MO PROF. VALENTINA ZAPPULLI

DOTTORANDA: ROBERTA RASOTTO

31 GENNAIO 2011

RIASSUNTO

Il tumore mammario è la neoplasia più frequente nei cani femmina. I dati relativi all'eziopatogenesi, all'epidemiologia e al comportamento biologico di questa forma tumorale sono ancora in parte incompleti e controversi. È risaputo inoltre che tale forma tumorale è caratterizzata da un'elevata eterogeneità morfologica e la mancanza di precisi e definiti criteri diagnostici istopatologici rende spesso difficile un'adeguata standardizzazione nella formulazione della diagnosi. Da queste considerazioni è nata l'esigenza di approfondire alcuni aspetti classificativi nell'ambito di una collaborazione internazionale che ha portato alla definizione di criteri precisi per la distinzione tra forme neoplastiche benigne e maligne e alla stesura di una nuova classificazione per le lesioni iperplastiche/neoplastiche della mammella del cane. Tale classificazione si ispira al precedente sistema classificativo internazionale (WHO), ma risulta rielaborata e integrata con alcune nuove entità morfologiche. Applicando questi criteri e la nuova classificazione su 2143 campioni di tessuto mammario canino e mettendo i risultati ottenuti in relazione ad altre specifiche valutazioni morfologiche e a dati segnaletici e di *follow-up* è stato possibile mettere in risalto alcuni aspetti, in parte noti e in parte nuovi, relativi all'epidemiologia e al comportamento biologico di questa forma tumorale. Si sono ad esempio messi in evidenza la presenza di razze meno rappresentate tra i soggetti portatori di tumori mammari maligni, un aumento di incidenza delle forme maligne al crescere dell'età e una certa tendenza degli animali sterilizzati, rispetto agli interi, a presentare forme tumorali leggermente diverse, apparentemente più aggressive. Per molte delle tipologie tumorali descritte è stato riconosciuto un comportamento biologico specifico. È stato particolarmente interessante a fini classificativi e prognostici approfondire lo studio, con ausilio immunohistochimico, di una nuova tipologia tumorale (carcinoma e mioepitelioma maligno) caratterizzata dalla presenza di cellule mioepiteliali maligne. È stata inoltre

dimostrata o in altri casi confermata e dettagliata, la valenza prognostica di alcuni parametri quali il diametro tumorale, l'invasione del sistema linfatico, il grado istologico di malignità, l'infiltrazione periferica e la presenza di pattern micropapillare.

ABSTRACT

Mammary tumors are the most common neoplasms in female dogs. Available data regarding the etiopathogenesis, the epidemiology and the biological behavior of this type of tumor are still incomplete and controversial. It is widely known that they are highly heterogeneous in morphology and that the lack of precise histopathological diagnostic criteria does not allow an adequate standardization of the diagnosis. Based on these considerations, and as a part of an international collaboration, we studied in details some aspects regarding the classification of these neoplasms. This allowed us to define precise criteria for the distinction between benign and malignant mammary tumors and to write a new classification for the hyperplastic/dysplastic and neoplastic lesions of canine mammary gland. The new classification is a modification of the internationally accepted WHO classification and incorporates some new morphological entities. These standardized criteria were applied on 2143 samples of canine mammary tissue. Other specific morphological characteristics were also evaluated. Relations between all the results obtained, and signalment, and *follow-up* data were investigated to improve the knowledge about the epidemiology and biological behavior of canine mammary tumors. We noticed that some dog breeds were less represented as carriers of malignant tumors and that in general the incidence of malignant tumor increased with age. In addition, we found that spayed animals, compared to intact ones, tend to have slightly different, apparently more aggressive, mammary tumors. For many tumors subtypes a specific biological behavior was recognized. Of particular interest was the immunohistochemical study of a new tumor subtype (carcinoma and malignant myoepithelioma) characterized by the presence of malignant myoepithelial cells. The prognostic value of different parameters such as tumor diameter, invasion of the lymphatic

system, grade of malignancy, presence of peripheral infiltration and of a micropapillary pattern were discussed in details.

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 La ghiandola mammaria	7
1.1.1 Sviluppo della ghiandola mammaria	7
1.1.2 Struttura della ghiandola mammaria	8
1.2 Il tumore mammario del cane	11
1.2.1 Aspetti epidemiologici ed eziopatogenetici	11
1.2.2 Presentazione clinica	18
1.2.3 Stadiazione	19
1.2.4 Terapia	21
1.2.5 Diagnosi: l'esame istopatologico	22
1.2.6 Esame immunohistochimico	30
2. SCOPI	37
3. MATERIALI E METODI	39
3.1 Organizzazione in fasi del progetto di dottorato	39
3.2 Fase 1 del progetto di dottorato	40
3.3 Fase 2 del progetto di dottorato	51
3.3.1 Studio classificativo-epidemiologico	52
3.3.1.1 Istopatologia	52
3.3.1.2 Immunohistochimica	53
3.3.1.3 Elaborazioni statistiche	58

3.3.2 Studio prognostico A	60
3.3.2.1 Istopatologia	60
3.3.2.2 Elaborazioni statistiche	61
3.3.3 Studio prognostico B	63
3.3.3.1 Istopatologia ed immunohistochimica	63
3.3.3.2 Elaborazioni statistiche	65
4. RISULTATI	67
4.1 Risultati di Fase 1	67
4.2 Risultati di Fase 2	68
4.2.1 Studio classificativo-epidemiologico	68
4.2.2 Studio prognostico A	86
4.2.3 Studio prognostico B	93
5. DISCUSSIONE	103
6. BIBLIOGRAFIA	117
APPENDICE FOTOGRAFICO	137
ALLEGATO A	

1. INTRODUZIONE

1.1 La ghiandola mammaria

1.1.1 Sviluppo della ghiandola mammaria

Nei mammiferi la mammella inizia a svilupparsi, a livello embrionale, a partire dall'ectoderma. Compaiono dapprima due creste ectodermiche parallele, lateralmente alla linea mediana ventrale del feto, le **linee del latte**, al di sotto delle quali si trovano porzioni di mesoderma specializzato. Successivamente le linee del latte perdono la loro continuità e si formano, nel cane, due serie di 5 gruppi di cellule ectodermiche disposti in posizione paramediana dalla regione ascellare a quella inguinale che costituiscono gli abbozzi delle diverse ghiandole mammarie. In uno stadio più avanzato le cellule ectodermiche, formando cordoni solidi, crescono e si approfondano nel mesenchima sottostante andando a costituire le **gemme mammarie**. Queste si allungano, ramificano e canalizzano dando origine ad un rudimentale albero duttale mentre dall'ectoderma epidermico sovrastante si sviluppano i capezzoli. Dalla nascita fino alla pubertà i dotti rudimentali continuano ad allungarsi proporzionalmente alla crescita del resto del corpo (accrescimento isometrico). Alla pubertà, sotto la stimolazione degli estrogeni ovarici, la mammella comincia a crescere in misura maggiore rispetto al resto del corpo (accrescimento allometrico) con una notevole estensione e ramificazione del sistema duttale nel grasso della regione mammaria e con formazione di piccole iniziali strutture alveolari (Dellmann & Eurell, 2000; Reece, 2009). Lo sviluppo mammario in questa fase sembra essere guidato da alcuni ispessimenti cellulari localizzati all'estremità distale dei dotti, i cosiddetti "*terminal end buds*" (**TEBs**), che scompaiono nell'animale adulto. Queste sono strutture specializzate considerate punti di proliferazione, differenziazione e apoptosi cellulare. Diversi studi effettuati sulla ghiandola mammaria del

topo hanno messo in evidenza la presenza all'apice dei TEBs di un monostrato esterno di cellule, le *cap cells*, che vengono considerate elementi progenitori multipotenti (*multipotent stem cells*) essenziali per l'imponente sviluppo puberale della ghiandola (Smalley & Ashworth, 2003).

1.1.2 Struttura della ghiandola mammaria

Nel cane adulto si rilevano 5 paia di ghiandole mammarie distinte in 2 paia toraciche (M1 e M2), 2 paia addominali (M3 e M4) e 1 paio inguinali (M5). A livello di ogni capezzolo si aprono da 7 a 16 dotti capezzolari. La ghiandola mammaria è una ghiandola sudoripara modificata, alveolare composta, con secrezione apocrina e merocrina. Nelle sezioni istologiche si identificano **dotti** e **lobuli**, associati ad uno stroma connettivale di sostegno contenente vasi e nervi. Il sistema dei dotti nel cane adulto prevede dall'interno verso l'esterno: dotto intralobulare (all'interno del lobulo), dotto interlobulare (all'esterno del lobulo), dotto lattifero (drena il secreto di un intero lobulo), seno lattifero (alla base del capezzolo), seno capezzolare e dotto capezzolare (Bacha & Bacha, 2000; Dellmann & Eurell, 2000). Ciascun lobulo è costituito da più alveoli associati ad un dotto intralobulare e supportati da sottile stroma connettivale (stroma intralobulare). Nel cane, in funzione della fase del ciclo estrale, si osservano leggere differenze morfologiche nella struttura della ghiandola. In particolare nelle fasi di proestro ed estro i lobuli, separati da abbondante stroma interlobulare, appaiono piccoli e inattivi. In diestro, sotto l'effetto del progesterone, i dotti si ramificano e si ha marcata differenziazione lobulo-alveolare. In anestro prevalgono invece aspetti di regressione e la ghiandola ritorna in una condizione di inattività/quiescenza (Rehm *et al.*, 2007; Chandra *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). In caso di gravidanza si osserva un ulteriore allungamento del sistema duttale; gli alveoli appaiono sviluppati, distesi e presentano attività secernente. Solo 2 mesi circa dopo il parto si comincia ad evidenziare una progressiva

riduzione del numero degli alveoli che tendono a collassare in associazione ad incremento del tessuto connettivo stromale (Orfanou *et al.*, 2010).

Nella ghiandola mammaria del cane, come in quella della donna, il seno capezzolare e il dotto capezzolare sono tappezzati da epitelio pluristratificato squamoso che si continua con l'epidermide esterna. Le restanti porzioni del sistema duttale e gli alveoli della ghiandola sono classicamente rivestiti da un doppio strato di cellule: **strato luminale** (più interno) di cellule epiteliali che, in particolare a livello alveolare, sono deputate alla produzione del secreto, e **strato basale/mioepiteliale** (più esterno) di cellule con fenotipo misto epiteliale/contrattile la cui funzione più tipica e nota consiste nel contrarsi sotto stimolazione dell'ossitocina favorendo l'eiezione del latte. Entrambi gli strati cellulari sono posti al di sopra della membrana basale che li separa dallo stroma circostante dove si rinvengono fibroblasti e rari miofibroblasti (Bacha & Bacha, 2000; Dellmann & Eurell, 2000). L'organizzazione strutturale appena descritta è schematizzata in Figura 1.

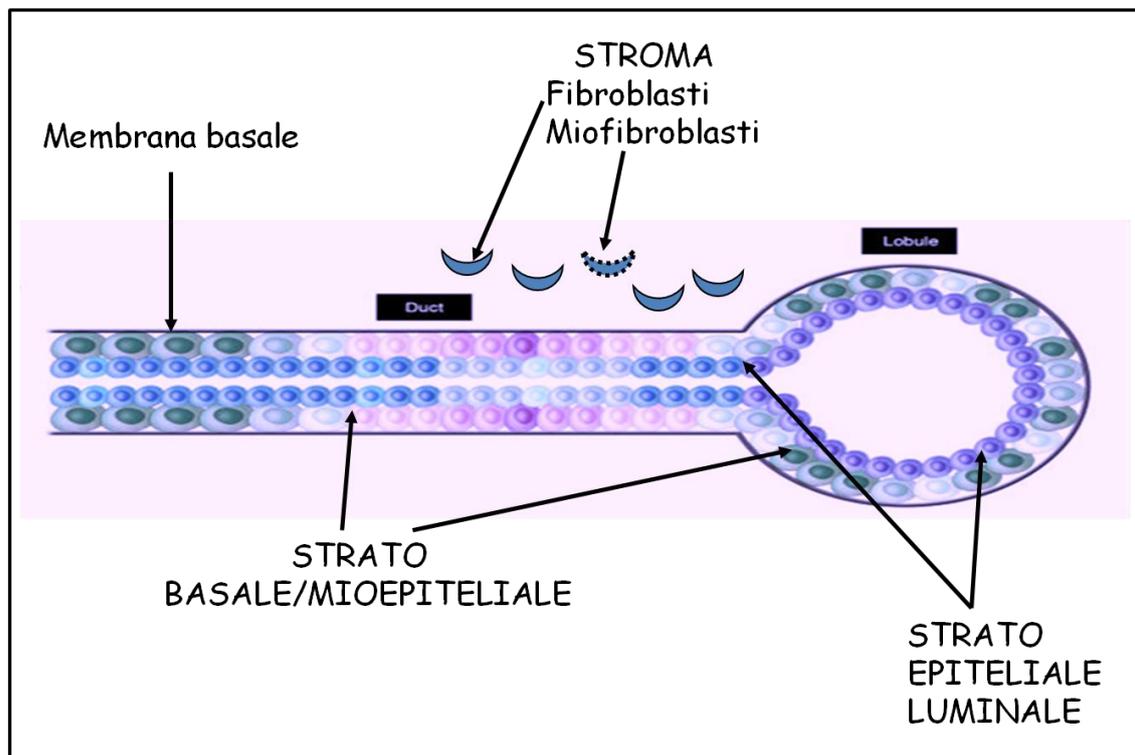


Figura 1. Struttura semplificata della ghiandola mammaria (da Polyak *et al.*, 2007, *modificata*).

In medicina umana considerazioni teoriche relative alla notevole capacità di espansione e rigenerazione della ghiandola mammaria nelle diverse fasi del ciclo produttivo fanno presupporre la presenza in sede mammaria, anche dopo la pubertà, di **cellule staminali adulte** (multipotenti), tipiche dei tessuti a rinnovamento continuo, da cui deriverebbero attraverso stadi differenziativi intermedi sia le cellule luminali che quelle mioepiteliali (Smalley & Ashworth, 2003). Le evidenze scientifiche a sostegno dell'esistenza di questi elementi progenitori sono varie, tra queste l'osservazione in topi trapiantati di una completa rigenerazione della ghiandola mammaria a partire da sospensioni cellulari o piccoli frammenti di ghiandola (Coppock & Clarke, 2004). Oltre all'elevata capacità differenziativa, un'altra caratteristica peculiare delle cellule staminali adulte è l'immortalità. Somministrando ai topi un precursore del DNA marcato (radioattivo) come per esempio timidina triziata si identifica in effetti nella ghiandola mammaria un piccolo pool cellulare che, mantenendo nel tempo la

marcatura, dimostra la sua persistenza nel tessuto (Lynch *et al.*, 2006, Molyneux *et al.*, 2007). Negli ultimi 10 anni sono state messe a punto diverse condizioni sperimentali per l'isolamento e la propagazione delle cellule staminali mammarie di topo e di donna tra cui l'impiego di specifici marcatori di superficie (CD44 e ALDH1), la valutazione della capacità di esclusione del colorante vitale Hoechst 33342 e la crescita clonale in vitro come sfere in sospensione (Coppock & Clarke, 2004; Neumeister *et al.*, 2010). Quest'ultima tecnica ha permesso recentemente l'isolamento in vitro di cellule mammarie canine con caratteri di staminalità (autorinnovamento e multipotenza) (Cocola *et al.*, 2009). Rimane oggetto di discussione la precisa posizione delle cellule staminali adulte nella ghiandola mammaria nelle diverse specie; diversi autori suggeriscono una possibile localizzazione basale/soprabasale (Smalley & Ashworth, 2003).

1.2. Il tumore mammario del cane

1.2.1 Aspetti epidemiologici ed eziopatogenetici

Il tumore mammario è la neoplasia più frequente nei cani femmina. I dati di **incidenza** variano leggermente a seconda delle aree geografiche e dello studio. Ad oggi appare evidente una maggior frequenza di questo tumore in Europa rispetto agli Stati Uniti (Sorenmo, 2003). In Italia un recente studio riporta, per una popolazione di cani provenienti dalle provincie di Venezia e Vicenza, una frequenza di questa neoplasia pari al 56% di tutte le forme tumorali nei soggetti femmina (Vascellari *et al.*, 2009). Uno studio analogo condotto nell'area di Genova ha messo in evidenza che il 70% dei tumori maligni dei cani femmina originano dalla mammella (Merlo *et al.*, 2008). Questa patologia risulta invece molto rara nei cani maschi (Misdorp, 2002).

L'età dei soggetti è considerata un importante fattore di rischio per lo sviluppo di questa neoplasia che classicamente si rinviene in animali adulti o anziani. Uno studio condotto su un'ampia colonia di cani Beagle con tumori mammari spontanei ha messo in evidenza che il rischio di sviluppare questa neoplasia diventa significativo attorno agli 8 anni e aumenta in modo lineare al crescere dell'età (Taylor *et al.*, 1976). In un altro lavoro il picco massimo di incidenza è stato osservato in soggetti di età compresa tra i 9 e gli 11 anni (Dorn *et al.*, 1968). I cani che sviluppano tumori mammari in età più avanzata sembrano inoltre avere un *follow-up* clinico più sfavorevole con tempi di sopravvivenza più brevi. Questo sembra essere dovuto non tanto all'insorgenza di forme tumorali più aggressive, ma alla maggior possibilità che si verifichino complicanze post-operatorie o che i soggetti muoiano per altre cause non correlate al tumore (Sorenmo, 2003). Analogamente nella donna l'incidenza del tumore al seno aumenta al crescere dell'età con un picco tra i 75 e gli 80 anni; sono però ben note la spiccata aggressività e l'elevata capacità metastatizzante delle forme tumorali che insorgono in giovane età (< 40 anni) (Robbins & Cotran, 2010; Beadle *et al.*, 2011).

A seconda dello studio epidemiologico variano le **razze** canine che più spesso appaiono colpite da questa neoplasia, presumibilmente a causa della diversa distribuzione delle razze stesse nelle differenti aree geografiche prese in considerazione. I ricercatori veterinari non sono quindi riusciti fin'ora a chiarire se esiste o meno una predisposizione di razza per lo sviluppo di questa neoplasia. In ogni caso le razze toy come Maltese, Chihuahua, West Highland White Terrier, Yorkshire Terrier, Bichon Frise e altre come Cocker Spaniel, English Setter, English Springer Spaniel, Pointer e Pastore Tedesco sono le più rappresentate nella maggior parte delle popolazioni di cani con tumori mammari fino ad oggi studiate (Priester *et al.*, 1971; Cohen *et al.*, 1974; Mitchell *et al.*, 1974; Moe, 2001; Richards *et al.*, 2001; Sorenmo, 2003; Engenvall *et al.*, 2005; Brønden *et al.*, 2010).

Le differenze di etnia e di razza sembrano avere un ruolo sulla presentazione del tumore al seno della donna, in particolare con riguardo al momento di insorgenza e ai tempi di sopravvivenza. Ad esempio, nelle donne di colore, in quelle di etnia ispanica e nelle indiane americane il tumore della mammella viene più spesso diagnosticato ad uno stadio più avanzato, con sopravvivenza inferiore rispetto alle donne bianche di etnia non ispanica e a quelle asiatiche. Queste differenze sono imputabili in parte a fattori socioeconomici e legati allo stile di vita e in parte a caratteristiche intrinseche delle neoplasie. Le donne di colore e quelle ispaniche, infatti, sembrano sviluppare con maggior frequenza forme tumorali poco differenziate e negative ai recettori ormonali (Joslyn, 2002; Ghafoor *et al.*, 2003; Robbins & Cotran, 2010).

Il 13% delle donne che presentano un tumore al seno hanno almeno un familiare stretto affetto dalla stessa patologia (soprattutto nei casi giovanili). Negli ultimi anni sono stati isolati due geni (**BRCA-1** e **BRCA-2**) le cui mutazioni predispongono all'insorgenza di tumore alla mammella e all'ovaio e che si stima siano responsabili di circa l'80% delle sindromi ereditarie che interessano questi due organi e di due terzi dei tumori ereditari alla sola mammella. Seppur meno frequenti, altri disordini genetici associati ad un maggior rischio di tumore al seno nella donna sono la sindrome di Li-Fraumeni e la sindrome di Cowden, dovute a mutazioni germinali in due geni oncosoppressori, rispettivamente **P53** e **PTEN** (Robbins & Cotran, 2010; Metcalfe *et al.*, 2010; Pruthi *et al.*, 2010). Questi aspetti sono stati studiati fin'ora in modo meno approfondito nella specie canina, poiché il genoma del cane è stato mappato completamente solo di recente. Alcune variazioni nell'espressione dei geni sopra citati e soprattutto dei loro prodotti proteici sono state osservate nelle neoplasie mammarie del cane e del gatto (Lee *et al.*, 2004; Rodo & Malicka, 2008; Klopfleisch & Gruber, 2009; Ressel *et al.*, 2009; Uva *et al.*, 2009). Nel 2009 Rivera e collaboratori hanno identificato all'interno di un gruppo di cani English Springer Spaniel (212 con tumori

mammari e 147 sani) un rischio 4 volte maggiore di sviluppo di neoplasie mammarie per i soggetti portatori di mutazioni germinali ai geni BRCA-1 e BRCA-2 (Rivera *et al.*, 2009). In uno studio precedente si erano individuate in una colonia di cani Beagle alcune linee familiari con differenze nell'età di insorgenza di tumori mammari sia benigni che maligni, ma i ricercatori non erano stati in grado di identificare le alterazioni genetiche alla base di tali differenze (Schafer *et al.*, 1998). Il ruolo della **familiarità** nell'eziopatogenesi del tumore mammario del cane necessita quindi di essere chiarito con nuovi studi su ampie popolazioni (Rivera *et al.*, 2010).

Nella carcinogenesi mammaria del cane e della donna un ruolo importante sembra essere svolto dagli **ormoni ovarici**. Ruolo che spiegherebbe perché questa patologia è così rara nei soggetti maschi. I meccanismi eziopatogenetici alla base dello sviluppo tumorale mammario sono stati studiati prevalentemente in medicina umana e per gli **estrogeni** è stata riconosciuta una funzione critica in particolare nella fase di promozione neoplastica. Questi ormoni, infatti, si legano a specifici recettori (ER) e stimolano la proliferazione delle cellule iniziate rendendole più suscettibili ad ulteriori errori genetici durante la replicazione del DNA e riducendo il tempo a disposizione per la riparazione di tali errori. Di recente, inoltre, è stato recentemente evidenziato un ruolo degli estrogeni nella fase di iniziazione tumorale visto che dal metabolismo dell'estradiolo possono derivare molecole genotossiche e radicali liberi che danneggiano il DNA (Clemons & Goss, 2001; Terashima *et al.*, 2001; Cleary and Grossmann, 2009; Senten *et al.*, 2009).

I dati circa le influenze del **progesterone** sulla carcinogenesi mammaria sono invece più contrastanti. Da un lato, analogamente agli estrogeni, viene suggerito un ruolo nella promozione neoplastica mediato da interazione recettoriale (PR). Il meccanismo d'azione con cui il progesterone sembra indurre i suoi effetti proliferativi, sia nel cane che nella donna, comprende la stimolazione di una produzione locale di ormone della crescita (GH), di

prolattina e del fattore di crescita insulino-simile (*insulin-like growth factor-1*, IGF-1) (Selman *et al.*, 1994; Mol *et al.*, 1999; Gregoraszcuk *et al.*, 2001). Dall'altra parte in altri studi si segnala nettamente il fatto che questo ormone sia in grado di diminuire la proliferazione cellulare indotta dagli estrogeni; i livelli sierici di progesterone appaiono inversamente correlati al rischio di sviluppare un carcinoma mammario nelle donne in premenopausa (Foidart *et al.*, 1998; Kaaks *et al.*, 2005). Queste apparenti contraddizioni vengono spiegate da un modello recentemente proposto in cui viene sottolineata l'importanza dei diversi metaboliti derivanti dal progesterone, prodotti grazie all'attività di degradazione di differenti enzimi. Questi metaboliti agiscono come ormoni indipendenti con azioni opposte sul ciclo cellulare, sull'apoptosi e sull'interazione con molecole citoscheletriche e di adesione. In particolare il 3 α -diidrossiprosterone (3 α HP) sembra inibire la proliferazione e il distacco delle cellule mammarie favorendo così una condizione di normalità, mentre il 5 α -diidrossiprosterone (5 α HP), avendo effetti diametralmente opposti, sostiene la crescita tumorale e potenzialmente favorisce il processo di metastatizzazione (Wiebe, 2006).

Sia nella donna che nel cane gli effetti associati alla stimolazione ormonale apparentemente sembrano essere **dose-dipendenti** per cui la durata dell'esposizione ormonale risulta essere decisiva. Cagne **sterilizzate** prima del primo estro hanno un rischio pari allo 0,5% di sviluppare neoplasie mammarie, ma tale rischio sale all'8% e al 26% se l'ovariectomia viene eseguita più tardi, rispettivamente tra il primo e il secondo estro e dopo il secondo estro. Non viene più riscontrato alcun effetto protettivo quando la sterilizzazione viene effettuata in fasi successive della vita riproduttiva dell'animale (Schneider *et al.*, 1969; Taylor *et al.*, 1976; Misdorp, 1988; Sonnenschein *et al.*, 1991).

Altri aspetti della sfera riproduttiva quali le irregolarità del ciclo estrale, episodi di pseudo-gravidanza e la gravidanza stessa, pur determinando fluttuazioni dei livelli ormonali, non sembrano influenzare significativamente il rischio di insorgenza di neoplasie mammarie

nel cane (Brodey *et al.*, 1966; Schneider *et al.*, 1969; Taylor *et al.*, 1976). Al contrario, una maggior probabilità di sviluppare questo tumore è stata associata alle **terapie ormonali** utilizzate per prevenire o ritardare la comparsa dell'estro. In particolare cani trattati con progestinici sviluppano più spesso e più precocemente rispetto ai controlli lesioni neoplastiche mammarie, che per alcuni autori sono, nella maggior parte dei casi, di natura maligna (Geil & Lamar, 1977; Giles *et al.*, 1978; Kwapien *et al.*, 1980; Concannon *et al.*, 1981; Misdorp, 1988; Selman *et al.*, 1995; Stovring *et al.*, 1997).

Nelle donne portatrici di mutazioni al gene BRCA1 con elevato rischio di cancro al seno l'ovariectomia profilattica sembra garantire, se effettuata prima dei 45 anni d'età, una significativa riduzione del rischio di insorgenza della patologia. Nello specifico si riduce la possibilità che si sviluppino tumori che esprimono i recettori ormonali, ma rimane invariato il rischio di comparsa di tumori negativi per i medesimi recettori (Press *et al.*, 2010). Effetti simili si ottengono somministrando farmaci che bloccano l'azione degli estrogeni (es. tamoxifene) o che ne inibiscono la sintesi (es. inibitori delle aromatasi). L'impiego invece di terapie ormonali sostitutive per contrastare alcuni effetti collaterali della menopausa si associa ad un aumento di 1,7 volte del rischio di comparsa di carcinomi mammari, che nella maggior parte dei casi esprimono i recettori per gli estrogeni (ER). Studi che hanno esaminato nella donna l'uso dei contraccettivi orali come un fattore di rischio per questa patologia hanno invece fornito risultati contrastanti (Marchbanks *et al.*, 2002; Robbins & Cotran, 2010; Hunter *et al.*, 2010).

Altri fattori che influenzano l'esposizione cumulativa del soggetto agli ormoni, in particolare agli estrogeni, sono la **dieta** e la **conformazione corporea**. Sia nel cane che nella donna una dieta ricca di grassi e in particolare un consumo eccessivo di carni rosse sembrano accrescere il rischio di neoplasie alla mammella. Un analogo incremento di rischio è associato a condizioni di sovrappeso/obesità, con alcune differenze tra le due specie. Nel cane sembra

essere significativa un'eventuale obesità in età giovanile (1 anno circa) (Perez Alenza *et al.*, 1998). Nella donna invece si è osservata una correlazione positiva tra indice di massa corporea e rischio di cancro al seno esclusivamente in fase post-menopausa (Cleary and Grossmann, 2009; Jevtic *et al.*, 2010). Si ipotizza che tale associazione sia dovuta all'aumento della produzione endogena di estrogeni nel tessuto adiposo mediata dalle aromatasi che li sintetizzano a partire dagli androgeni prodotti dal surrene e dalle ovaie nelle donne dopo la menopausa. In aggiunta l'obesità è associata anche ad iperinsulinemia, livelli più elevati di IGF-1 e più bassi della globulina legante gli ormoni sessuali (*sex hormone-binding globulin*, SHBG) con conseguente aumento della frazione circolante libera, quindi bio-disponibile, degli estrogeni (Cleary and Grossmann, 2009).

Alcuni studi sulla donna e sui modelli animali hanno dimostrato che anche altri ormoni, in particolare **prolattina** e **GH**, sono implicati nella crescita fisiologica e nei disordini proliferativi/neoplastici della mammella. Nell'ambito del processo carcinogenetico un ruolo importante viene imputato alla produzione locale mammaria di questi ormoni che si associa alla classica secrezione ipofisaria. Sono descritti inoltre fenomeni di *cross-talking* tra le vie di segnale di questi due ormoni e quelle degli ormoni steroidei (Wennbo & Törnell, 2000; Queiroga *et al.*, 2008; Thijssen, 2009). Nel cane ad esempio il legame dei progestinici col recettore PR induce la sintesi locale mammaria di GH, il quale esercita un'azione proliferativa sia direttamente che indirettamente attraverso la produzione di IGF-1, potente mitogeno e inibitore dell'apoptosi (Selman *et al.*, 1994; Mol *et al.*, 1999). L'importanza dell'asse GH-IGF-1 nello sviluppo tumorale sembra essere confermata dal rischio sensibilmente più elevato per le donne alte e per quelle affette da acromegalia di sviluppare carcinomi alla mammella e in altri organi (Gunnell *et al.*, 2001).

In letteratura sono presenti diversi studi che hanno investigato possibili connessioni tra l'esposizione a **contaminanti ambientali**, soprattutto con sospetti effetti estrogenici, e il

rischio di neoplasie mammarie, ma fin'ora non vi sono a riguardo dati certi (Robbins & Cotran, 2010). Nel tessuto adiposo alla periferia di alcuni carcinomi mammari canini di grado elevato si è identificata con la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) la presenza di insetticidi piretroidi, tuttavia il significato biologico di tale reperto necessita di essere ulteriormente investigato (Andrade *et al.*, 2010).

1.2.2 Presentazione clinica

I tumori mammari nel cane si presentano come noduli **singoli** o **multipli**, generalmente facilmente palpabili all'interno del parenchima mammario. Contrariamente a quanto si riscontra nella donna, la condizione di multinodularità nella cagna è molto frequente, stimabile fino al 66% dei casi (Gollamudi *et al.*, 1997; Misdorp, 2002; Sorenmo *et al.*, 2009). Uno studio che ha indagato specificamente questa condizione, seppur su una bassa numerosità di casi, ha dimostrato generalmente un'assenza di relazione istologica tra noduli diversi. La sopravvivenza post-operatoria media non sembra influenzata nella cagna dalla condizione di multinodularità, a differenza della gatta dove si osserva un maggior rischio di decesso poiché le lesioni multiple sono spesso associate ad invasione linfatica e vengono considerate metastasi intramammarie di un iniziale processo maligno unicentrico (Apostolou *et al.*, 1998).

Nella specie canina le ghiandole M4 e M5 sono quelle più spesso interessate dai tumori mammari; la localizzazione delle lesioni non sembra tuttavia rivestire significato prognostico (Taylor *et al.*, 1976; Moulton *et al.*, 1986; Hellmèn *et al.*, 1993; Benjamin *et al.*, 1999). Al momento della visita clinica i noduli possono essere ulcerati o meno, fluttuanti o adesi ai piani sottostanti e hanno dimensioni molto variabili (Dobson & Morris, 2001). Il **diametro tumorale** è considerato un parametro importante visto che tumori più grandi hanno una maggior probabilità di rivelarsi maligni all'esame istopatologico e in particolare quelli

con diametro superiore a 3 cm o 5 cm, a seconda dello studio, si associano ad un *follow-up* clinico più sfavorevole (Kurzman *et al.*, 1986; Yamagami *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2005; Sorenmo *et al.*, 2009). Se alla visita clinica si rileva linfadenomegalia dei linfonodi regionali è opportuno sospettare un possibile coinvolgimento metastatico. Va tenuto in mente che in caso di presenza di tumori mammari il normale **drenaggio linfatico** delle ghiandole mammarie può essere alterato, pertanto possono essere coinvolti, oltre ai linfonodi ascellari e inguinali superficiali, anche quelli sternali, iliaci mediali e poplitei a seconda della posizione del tumore primario (Tabella 1) (Patsikas *et al.*, 1996; Patsikas *et al.*, 2006). Eventuali metastasi a distanza, che generalmente si localizzano a polmone, fegato, rene, milza e ossa, possono determinare sintomi sistemici (Dobson & Morris, 2001).

Tabella 1. Drenaggio linfatico delle ghiandole mammarie del cane in condizioni di normalità e in presenza di neoplasie mammarie (Patsikas *et al.*, 1996; Patsikas *et al.*, 2006).

Ghiandola mammaria	Drenaggio linfatico normale	Drenaggio linfatico in presenza di neoplasia mammaria
M1	LN ascellare	LN ascellare, LN sternale
M2	LN ascellare	LN ascellare, LN sternale
M3	LN ascellare, LN inguinale superficiale	LN ascellare, LN inguinale superficiale, LN iliaco mediale
M4	LN inguinale superficiale	LN inguinale superficiale, LN ascellare
M5	LN inguinale superficiale	LN inguinale superficiale, LN popliteo

LN = linfonodo

1.2.3 Stadiazione

In cani con tumori mammari una certa rilevanza in ambito clinico è assunta dalla stadiazione (*staging*) che definisce lo stato clinico della patologia al momento della diagnosi considerando le dimensioni del tumore primario (T), l'interessamento dei linfonodi regionali

(confermato con esame citologico o istopatologico) (N) e la presenza di metastasi sistemiche (M). Sono stati pubblicati due diversi sistemi per stadiare le neoplasie mammarie del cane, uno proposto nel 1980 dalla *World Health Organization* (WHO) e una versione WHO-modificata più recente (Owens, 1980; Rutteman *et al.*, 2001). Questi due sistemi sono messi a confronto in Tabella 2.

Tabella 2. Sistemi di stadiazione per il tumore mammario del cane (Owens, 1980; Rutteman *et al.*, 2001).

Sistema di stadiazione originale WHO				Sistema di stadiazione WHO-modificato			
Stadio I	T _{1 a, b, c}	N ₀	M ₀	Stadio I	T ₁	N ₀	M ₀
Stadio II	T ₀	N ₁	M ₀	Stadio II	T ₂	N ₀	M ₀
	T _{1a, b, c}	N ₁	M ₀				
	T _{2 a, b, c}	N ₀ o N ₁	M ₀				
Stadio III	T _{3 a, b, c}	Qualsiasi N	M ₀	Stadio III	T ₃	N ₀	M ₀
	Qualsiasi T	Qualsiasi N _b	M ₀				
Stadio IV	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M ₁	Stadio IV	Qualsiasi T	N ₁	M ₀
No stadio V				Stadio V	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M ₁
ABBREVIAZIONI							
T: tumore primario (a, non adeso; b, adeso alla cute; c, adeso ai muscoli)				T: tumore primario			
T ₀ : no evidenze di tumore							
T ₁ : diametro maggiore del tumore < 3 cm (a, b, c)				T ₁ : diametro maggiore del tumore < 3 cm			
T ₂ : diametro maggiore del tumore tra 3 e 5 cm (a, b, c)				T ₂ : diametro maggiore del tumore tra 3 e 5 cm			
T ₃ : diametro maggiore del tumore > 5 cm (a, b, c)				T ₃ : diametro maggiore del tumore > 5 cm			
T ₄ : carcinoma infiammatorio							
N: stato linfonodo regionale (a, non adeso; b, adeso)				N: stato linfonodo regionale			
N ₀ : no metastasi				N ₀ : no metastasi			
N ₁ : metastasi linfonodo ipsilaterale (a, b)				N ₁ : metastasi			
N ₂ : metastasi linfonodi di entrambi i lati (a, b)							
M: metastasi a distanza				M: metastasi a distanza			
M ₀ : no metastasi a distanza				M ₀ : no metastasi a distanza			
M ₁ : metastasi a distanza				M ₁ : metastasi a distanza			

Nel sistema originale riveste una notevole importanza la grandezza del tumore, mentre in quello modificato viene attribuita maggior rilevanza al coinvolgimento linfonodale che, se presente, determina di *default* l'assegnazione di uno stadio IV indipendentemente dalle dimensioni del tumore primario (Owens, 1980; Rutterman *et al.*, 2001).

L'impiego di questi sistemi favorisce una raccolta standardizzata e accurata dei dati clinici, permette di comparare i casi tra loro e facilita la comunicazione tra i veterinari. Per quanto a riguardo manchino studi prognostici su ampia scala, sono state messe in evidenza con l'utilizzo di entrambi i sistemi delle differenze di *follow-up* clinico tra alcuni degli stadi (Yamagami *et al.*, 1996; Philibert *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005).

1.2.4 Terapia

Il trattamento d'elezione per lesioni nodulari a carico del parenchima mammario nel cane è l'**exeresi chirurgica**, a cui deve seguire esame istopatologico per definire la natura del processo in atto. Il tipo di approccio chirurgico varia a seconda del numero, delle dimensioni, della localizzazione delle lesioni e dell'eventuale sospetto di coinvolgimento linfonodale (Misdorp, 2002; Sorenmo, 2003). Nella maggior parte dei lavori non si sono evidenziati benefici particolari dall'eseguire, in concomitanza con la mastectomia, l'**ovariectomia**, per quanto questo argomento sia ancora molto dibattuto (Schneider *et al.*, 1969; Selman *et al.*, 1994; Yamagami *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 1998; Sorenmo *et al.*, 2000). Per il tumore al seno della donna attualmente sono a disposizione numerose **terapie mediche adiuvanti**, da associarsi al trattamento chirurgico, mirate a seconda dello specifico tipo tumorale diagnosticato sulla base di criteri morfologici, di espressione proteica e genica (Robbins & Cotran, 2010). Alcune di queste terapie sono state testate anche nel cane con risultati tuttavia insoddisfacenti, queste pertanto non vengono di norma impiegate nella pratica clinica veterinaria (Sorenmo, 2003).

1.2.5 Diagnosi: l'esame istopatologico

Nonostante l'impiego sempre più frequente in oncologia umana di tecniche diagnostiche molecolari innovative, queste non sostituiscono ma affiancano l'**esame istopatologico** che rimane ancora oggi, per la maggior parte delle forme tumorali, la tecnica diagnostica d'elezione (Robbin & Cotran, 2009). L'esame istopatologico è altrettanto importante in diagnostica oncologica veterinaria. Per le lesioni proliferative della mammella del cane esso è considerato più sensibile e accurato dell'esame citologico (Misdorp, 2002; Sorenmo, 2003; Otoni *et al.*, 2010). L'obiettivo principale dell'esame istopatologico è quello di classificare il più precisamente possibile le lesioni mammarie del cane allo scopo di fornire informazioni che siano utili al veterinario clinico nella formulazione della prognosi. La **mancanza di linee guida diagnostiche precise e standardizzate** ha portato spesso però in passato a risultati poco uniformi e comparabili, complicando la valutazione degli studi sul comportamento biologico di questa forma tumorale canina e mettendo quindi in discussione la valenza diagnostica e prognostica dell'esame stesso (Fowler *et al.*, 1974; Monlux *et al.*, 1977; Misdorp *et al.*, 1990; Benjamin *et al.*, 1999; Misdorp, 2002). Una delle principali ragioni della scarsa standardizzazione dell'esame istopatologico è l'elevata **eterogeneità morfologica** delle lesioni proliferative mammarie del cane in cui, molto più spesso che nella donna e nella gatta, sono coinvolte popolazioni cellulari multiple, con pattern di distribuzione diversi e aspetti citomorfologici variabili (Misdorp, 2002). In particolare una caratteristica abbastanza tipica delle lesioni mammarie in questa specie è il frequente ed evidente coinvolgimento di **elementi mioepiteliali** dei quali è molto discusso il ruolo nella genesi tumorale e nell'influenzare il comportamento biologico del tumore (Misdorp *et al.*, 1999; Misdorp, 2002). Per quanto l'argomento sia dibattuto, si ipotizza che tali elementi possano svolgere una funzione protettiva inibendo la crescita, l'invasione e l'angiogenesi delle cellule epiteliali luminali

tumorali, conferendo pertanto alle forme neoplastiche che li contengono un comportamento biologico meno aggressivo rispetto alle altre forme tumorali (Misdorp & Hart, 1976; Misdorp *et al.*, 1999). La **classificazione** più recente dei **tumori mammari del cane** è stata approvata dall'organizzazione mondiale della sanità (**WHO**) ed è stata pubblicata dalla sezione veterinaria dell'*Armed Force Institute of Pathology* (AFIP) nel **1999**. Per quanto non manchino gli aspetti in comune con la classificazione impiegata in medicina umana, la principale differenza sta nel fatto che in quella del cane i carcinomi non vengono distinti in lobulari e duttali. Questa terminologia è stata impiegata inizialmente in medicina umana viste alcune somiglianze morfologiche dei carcinomi con i lobuli e i dotti sani che facevano ipotizzare origini distinte dalle due diverse porzioni della ghiandola. Questi termini sono ancora oggi utilizzati in medicina umana, ma assumono una connotazione esclusivamente descrittiva, poiché ci sono numerose evidenze a supporto di un'origine unica dei vari carcinomi della mammella della donna, ossia a livello della porzione terminale dell'albero duttale (*terminal duct lobular unit*, TDLU) (Robbins & Cotran, 2010).

Data l'incerta origine dei tumori mammari del cane e le idee poco chiare sul ruolo del mioepitelio, i criteri istogenetici sono stati esclusi dalla classificazione WHO del 1999, basata esclusivamente su indici **descrittivo/morfologici**. Questi sono stati in parte correlati a dati di *follow-up*, pertanto per alcune classi morfologiche sono stati descritti **comportamenti biologici specifici**. La classificazione viene qui di seguito schematicamente riportata.

TUMORI MALIGNI

Carcinoma non infiltrante (*in situ*): *neoplasia epiteliale con caratteristiche istologiche di malignità che non invade la membrana basale della struttura preesistente*. Le cellule tumorali possono assumere talvolta pattern cribriforme (a setaccio) o “comedo” (solido con necrosi centrale).

Carcinoma complesso: *carcinoma composto da cellule epiteliali luminali e cellule mioepiteliali.* Le cellule epiteliali luminali possono assumere pattern tubulopapillare oppure solido, mentre quelle mioepiteliali sono fusate ed organizzate in un pattern reticolare quasi stellato.

Carcinoma semplice: *carcinoma composto da un unico tipo di cellule epiteliali luminali o mioepiteliali.*

Carcinoma tubulopapillare: *carcinoma caratterizzato da un solo tipo di cellule che formano tubuli e/o papille.* Si riconoscono tre tipologie: carcinoma tubulare (presenza solo di tubuli), carcinoma papillare (presenza solo di papille) e carcinoma cistopapillare.

Carcinoma solido: *carcinoma caratterizzato da cellule tumorali disposte in cordoni, isole e nidi.*

Carcinoma anaplastico: *carcinoma altamente infiltrante composto da cellule epiteliali pleomorfe, non classificabile in una delle altre categorie di carcinoma.* È composto da cellule singole o in piccoli aggregati, con nuclei bizzarri, talvolta multinucleate.

Tipi speciali di carcinoma

Carcinoma a cellule fusate: *carcinoma composto da cellule fusate con pattern di organizzazione di tipo epiteliale.*

Carcinoma a cellule squamose: *carcinoma composto da isole e cordoni di cellule con aree di differenziazione squamosa.* Questi tumori, alcuni dei quali sembrano originare dal canale del capezzolo, dovrebbero essere distinti dal carcinoma a cellule squamose derivante dalla cute e dagli annessi. Una possibile variante è il carcinoma adenosquamoso che spesso contiene anche strutture ghiandolari.

Carcinoma mucinoso: *carcinoma caratterizzato da abbondante produzione di mucina.*

Carcinoma con cellule ricche in lipidi (lipid-rich): *carcinoma composto da cellule con citoplasma abbondante vacuolizzato ricco in lipidi neutri.*

Sarcomi

Fibrosarcoma: *tumore maligno dei fibroblasti con variabile produzione di collagene.*

Osteosarcoma: *sarcoma in cui le cellule neoplastiche producono osteoide e/o osso.*

Altri sarcomi

Carcinosarcoma: *tumore composto da cellule epiteliali maligne e da cellule connettivali maligne in variabili proporzioni.*

Carcinoma o sarcoma in tumore benigno: *tumore in cui si rinvencono foci distinti di cellule maligne all'interno di un adenoma complesso o di un tumore misto benigno.*

TUMORI BENIGNI

Adenoma

Adenoma semplice: *neoplasia benigna con presenza di cellule epiteliali luminali o mioepiteliali ben differenziate.*

Adenoma complesso: *tumore benigno composto da cellule epiteliali luminali associate a cellule mioepiteliali.*

Adenoma basaloide: *tumore benigno composto da cordoni o gruppi di cellule epiteliali basali monomorfe. Le cellule periferiche sono disposte a palizzata e appoggiano sulla membrana basale, quelle rivolte verso l'interno possono mostrare differenziazione squamosa o ghiandolare.*

Fibroadenoma: *tumore benigno composto da cellule epiteliali luminali frammiste a cellule stromali e talvolta mioepiteliali. Si distinguono un fibroadenoma a bassa cellularità ed uno ad alta cellularità.*

Tumore misto benigno: *tumore costituito da cellule benigne riferibili ad elementi epiteliali (luminali e/o mioepiteliali) e a cellule mesenchimali con cartilagine e/o osso e/o grasso.*

Papilloma duttale: *tumore lobulato o ramificato che cresce all'interno di un dotto disteso.*

TUMORI NON CLASSIFICATI

IPERPLASIE/DISPLASIE MAMMARIE

Iperplasia duttale: *lesione non neoplastica caratterizzata da una proliferazione intraduttale di cellule epiteliali, a volte con parziale o totale obliterazione del lume.*

Iperplasia lobulare

Iperplasia epiteliale: *proliferazione di cellule epiteliali dentro i duttuli intralobulari.*

Adenosi: *proliferazione non neoplastica dei duttuli intralobulari con presenza, in varie proporzioni, di tessuto epiteliale dei duttuli, cellule mioepiteliali e tessuto fibroso.*

Cisti

Ectasia duttale

Fibrosi focale (fibrosclerosi)

Ginecomastia: *iperplasia duttale e dello stroma della ghiandola mammaria di un individuo di sesso maschile; può far parte della sindrome da femminilizzazione associata ai sertoliomi testicolari.*

Le principali **critiche** mosse a questa classificazione che hanno portato ad una sua applicazione poco standardizzata e diffusa nella pratica diagnostica sono qui di seguito riassunte:

- Mancanza di criteri istologici precisi e definiti per la distinzione tra forme neoplastiche benigne e maligne. Questo spiega perché la percentuale di tumori mammari del cane considerati maligni varia molto (dal 26% al 73%) a seconda dello studio (Perez Alenza *et al.*, 2000; Misdorp, 2002).
- Riscontro non di rado nella pratica diagnostica di lesioni caratterizzate da una combinazione di aspetti morfologici riferibili a classi tumorali diverse o al contrario talvolta aspetti poco descritti e discussi nella classificazione e di conseguenza difficilmente inquadrabili (Misdorp *et al.*, 1999; Misdorp, 2002).

Le considerazioni precedenti e i risultati talvolta contrastanti degli studi prognostici hanno fatto nascere perplessità sull'effettiva utilità e spendibilità in ambito clinico di questo modello classificativo. È noto inoltre il comportamento biologico solo di alcune classi tumorali. In particolare è riportata un'aggressività via via crescente con diminuzione della percentuale di soggetti vivi a 2 anni dalla chirurgia andando dai carcinomi complessi, ai carcinomi semplici, ai sarcomi. All'interno dei carcinomi semplici quelli che sembrano avere una prognosi più sfavorevole sono i tumori anaplastici, seguiti in ordine di malignità decrescente dai solidi, dai tubulopapillari e dalle forme in situ (Bostoc, 1975; Misdorp & Hart, 1976; Shofer *et al.*, 1989; Yamagami *et al.*, 1996; Misdorp *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2005; Karayannopoulou *et al.*, 2005).

Oltre alla distinzione in classi morfologiche, ci sono altre valutazioni istopatologiche che in medicina umana vengono di *routine* inserite nel referto del patologo perché ritenute utili per la formulazione della prognosi e per decidere l'approccio terapeutico più appropriato. La rilevanza di alcune di queste valutazioni è stata studiata anche nel cane.

- **Margini di escissione:** numerosi studi in medicina umana hanno dimostrato per i carcinomi mammari estesi ai margini di escissione un maggior rischio di recidive

locali e quindi di ripresentazione della malattia, tanto che in questi casi si procede con un secondo intervento per rimuovere le cellule tumorali residue e migliorare il *follow-up* del paziente (Sigal-Zafrani *et al.*, 2004; Luini *et al.*, 2009; Panet-Raymond *et al.*, 2010). Nei cani con tumori mammari le conseguenze di un'escissione chirurgica incompleta sono poco studiate. In un lavoro la presenza di margini "positivi" è stata associata a tempi di sopravvivenza mediamente più brevi rispetto ad un'escissione completa (Shofer *et al.*, 1989).

- **Grado istologico di malignità:** questa valutazione viene eseguita esclusivamente sui carcinomi, permette di stimarne il grado di differenziazione ed è considerato in medicina umana un potente indicatore prognostico per il rischio di recidive e metastasi e per la sopravvivenza dei pazienti (Contesso *et al.*, 1987; Rivadeneira *et al.*, 2000; Lundin *et al.*, 2001); anche nel cane questo parametro sembra influenzare la sopravvivenza post-operatoria (Misdorp *et al.*, 1999; Misdorp, 2002; Karayannopolou *et al.*, 2005). Sono stati proposti in letteratura per il cane tre sistemi di *grading* che, analogamente a quelli impiegati in medicina umana (sistema Elston-Ellis e successive modifiche), valutano, con alcune differenze, la formazione di tubuli, l'attività mitotica (talvolta in associazione all'ipercromasia nucleare) e il pleomorfismo nucleare. Non è mai stata comparata l'efficienza predittiva di questi tre diversi sistemi pertanto non è chiaro quale sia quello più utile a fini prognostici (Misdorp, 2002; Karayannopolou *et al.*, 2005; Clemente *et al.*, 2010). Va inoltre segnalato che la formazione di tubuli, l'attività mitotica e il pleomorfismo nucleare, per quanto nell'insieme contribuiscano alla determinazione del grado istologico, in uno studio sono stati valutati singolarmente e non sono risultati essere fattori prognostici (Misdorp, 2002).

- **Altre caratteristiche tumorali:** nella donna la crescita infiltrante del tumore è considerata un indicatore prognostico negativo. Nel cane l'infiltrazione di cellule neoplastiche nello stroma circostante la lesione si associa ad un decorso clinico più sfavorevole. (Shofer et al., 1989; Hellmèn et al., 1993; Misdorp, 2002). Di recente i patologi umani hanno cominciato a segnalare nei loro referti la presenza di un altro aspetto istologico segno di aggressività, il cosiddetto **pattern micropapillare**, che consiste nella formazione da parte delle cellule neoplastiche di piccole papille prive di asse fibrovascolare, spesso circondate da lacune stromali vuote. Questo può essere il pattern prevalente di distribuzione delle cellule del tumore e di conseguenza la lesione viene classificata come carcinoma micropapillare invasivo che rappresenta un'entità morfologica a sé stante con elevato potere metastatizzante e prognosi spesso infausta (Nassar et al., 2004; Zekioglu et al., 2004). Alternativamente, il pattern micropapillare può essere rilevato solo in alcune aree focali/multifocali di tumori che, per prevalenza di altri aspetti morfologici, vengono considerati appartenenti ad altre classi tumorali. In questi casi è comunque ritenuto opportuno segnalare nella diagnosi la presenza, anche se minima, di pattern micropapillare poiché rispetto alle forme che ne sono prive è stata riscontrata una maggior propensione all'invasione linfatica e linfonodale (Ueng et al., 2009). Nel cane sono stati recentemente descritti alcuni rari casi di carcinoma micropapillare invasivo (per definizione con presenza di pattern micropapillare in più del 50% delle cellule tumorali) caratterizzati da comportamento clinico aggressivo (Cassali et al., 2002; Gama et al., 2008b). Non è però mai stato studiato con che frequenza e con quale significato il pattern micropapillare si riscontri in percentuali < al 50% nei tumori mammari del cane. In oncologia umana un altro reperto istopatologico che per diverse forme tumorali è considerato un'indicazione di scarsa differenziazione degli elementi neoplastici è il cosiddetto “**vasculogenic**

mimicry”, ossia la formazione da parte delle cellule neoplastiche di piccoli canali microvascolari intracellulari che si ipotizza possano costituire una via alternativa di approvvigionamento ematico per il tumore e che possano favorire la disseminazione metastatica (Folberg *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007). Questo aspetto morfologico nel caso della mammella è stato descritto sia nella donna che nella cagna prevalentemente in casi di carcinoma infiammatorio che è una rara forma clinica con edema, gonfiore e dolorabilità associata a quei carcinomi mammari che invadono estesamente i vasi linfatici dermici sovrastanti (Clemente *et al.*, 2010).

- Infine, dato che la principale causa di morte in cani affetti da carcinoma mammario è la diffusione metastatica a distanza (polmoni, fegato, reni, milza, ossa) attraverso il sistema linfatico, è intuitivo comprendere che il reperimento di segni istologici di **invasione vascolare linfatica e/o linfonodale** costituisca un fattore prognostico negativo (Misdorp, 2002; Karayannopolou *et al.*, 2005). Il rischio di recidiva e di metastasi è decisamente maggiore nelle donne con linfonodi regionali positivi rispetto a quelle con linfonodi negativi e tale rischio è direttamente proporzionale al numero di linfonodi interessati (Utada *et al.*, 1999). Oltre alla rilevanza prognostica, lo studio dello status linfonodale in medicina umana ha importanza da un punto di vista terapeutico perché influenza la decisione di procedere o meno con protocolli chemioterapici adiuvanti e/o con radioterapia (Mieog *et al.*, 2009).

1.2.6 Esame immunoistochimico

L'esame immunoistochimico può venire utilizzato a supporto dell'esame istopatologico con due finalità principali: consentire una classificazione quanto più precisa possibile delle lesioni mammarie, in particolare di quelle con aspetti morfologici atipici, e fornire informazioni prognostiche aggiuntive. È frequente in medicina veterinaria, prevalentemente a scopo di

ricerca, l'utilizzo di **marcatori di differenziazione cellulare** per lo studio del fenotipo tumorale (Gärtner *et al.*, 1999; Tateyama *et al.*, 2001; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2002; Ramalho *et al.*, 2006).

Risulta fondamentale, per una corretta interpretazione dei risultati di espressione tumorale, conoscere come questi marcatori siano espressi in condizioni di normalità dalle varie sottopopolazioni cellulari costituenti la ghiandola mammaria (Griffey *et al.*, 1993; Reish-Filho & Tutt, 2008). Tra i marcatori di differenziazione si annoverano le **citocheratine (CK)** che sono filamenti intermedi che compongono il citoscheletro delle cellule epiteliali. Le CK vengono usualmente suddivise in due gruppi principali: le CK acide e quelle basiche. Esiste una corrispondenza tra la categoria di pH nella quale rientrano e il loro peso molecolare, infatti le CK basiche sono quelle a più alto peso molecolare e vanno dalla CK1 (68 kDa) fino alla CK6 (56 kDa), mentre le acide hanno peso molecolare minore e comprendono le CK dalla CK9 (64 kDa) alla CK19 (40 kDa). Le CK7 (54 kDa) e la CK8 (52,2 kDa) sono invece considerate di peso e carica elettrica intermedia (Moll *et al.*, 1982). La maggior parte delle CK sono state studiate nella ghiandola mammaria e hanno dimostrato una differente espressione nello strato luminale (+ per CK8/CK18/CK19/CK17) e basale/mioepiteliale (+ per CK5/CK6/CK14/CK17) (Destexhe *et al.*, 1993; Griffey *et al.*, 1993; Abd El-Rehim *et al.*, 2004). Anche la **vimentina (VIM)** appartiene al gruppo dei filamenti intermedi e sembra avere un ruolo nel mantenere l'integrità del citoplasma, stabilizzando le interazioni citoscheletriche, in particolare delle cellule di origine mesenchimale e nelle cellule mioepiteliali (Dabbs, 2006). L' **α -actina della muscolatura liscia (SMA)** è invece un microfilamento di 42-47 kDa con struttura globulare che viene espressa nelle cellule con capacità contrattile (cellule muscolari lisce, mioepiteliali e miofibroblasti) (Lazard *et al.*, 1993; Dabbs, 2006). Un altro marcatore che viene utilizzato per la caratterizzazione delle componenti cellulari della ghiandola mammaria è la **calponina**

(CALP). La CALP è una proteina specifica della muscolatura liscia ed esiste in due isoforme: la prima di 29 kDa, è caratteristica del tratto urogenitale, la seconda, di 34 kDa si trova nella muscolatura liscia vasale e viscerale. A livello mammario l'espressione della CALP è stata riconosciuta nelle cellule muscolari lisce dei vasi sanguigni, nelle cellule mioepiteliali e nei miofibroblasti (Draeger *et al.*, 1991; Lazard *et al.*, 1993). La proteina **p63**, infine, è un importante regolatore trascrizionale, strutturalmente simile alla proteina oncosoppressore p53, ed è coinvolta nello sviluppo dei tessuti epiteliali e nel mantenimento di un compartimento cellulare di riserva. Nella ghiandola mammaria questa proteina nucleare è considerata un marcatore dello strato basale/mioepiteliale, più specifico di SMA e CALP vista l'assenza di reattività nei confronti dei miofibroblasti stromali (Gama *et al.*, 2003; Ramalho *et al.*, 2006; Bertagnoli *et al.*, 2009). Le informazioni relative alla specificità dei principali marcatori di differenziazione per le varie sottopopolazioni cellulari della ghiandola mammaria del cane sono riassunte schematicamente in Tabella 3.

Tabella 3. Reattività delle varie sottopopolazioni cellulari della ghiandola mammaria sana del cane per i principali marcatori di differenziazione cellulare (Hellmén *et al.*, 1989; Destexhe *et al.*, 1993; Griffey *et al.*, 1993, Vos *et al.*, 1993; Gärtner *et al.*, 1999; Gama *et al.*, 2003).

Marcatori	Strato epiteliale luminale	Strato basale/mioepiteliale	Stroma	
			Fibroblasti	Miofibroblasti
CK8, CK18, CK19, CK7	+	-	-	-
CK5, CK6, CK14, CK17	-	+	-	-
SMA	-	+	-	+
CALP	-	+	-	+/-
VIM	-	+	+	+
p63	-	+	-	-

Negli ultimi 20 anni in medicina veterinaria questi marcatori sono stati impiegati principalmente per incrementare le conoscenze sull'istogenesi dei tumori mammari, in particolare di quelli con **componente mioepiteliale** e **mesenchimale** (tumori complessi e

misti). Storicamente sono tre le ipotesi elaborate sull'origine degli elementi mesenchimali (cartilagine/osso) nei tumori misti del cane: 1) metaplasia a partire dalle cellule epiteliali 2) metaplasia a partire dalle cellule connettivali stromali 3) metaplasia a partire dalle cellule mioepiteliali (Misdorp *et al.*, 1999). Quest'ultima ipotesi è quella considerata più probabile. Si è infatti osservato nei tumori complessi/misti che le cellule mioepiteliali, finché rimangono in posizione basale, mantengono il loro normale profilo immunoistochimico (vedi Tabella 3), ma quando proliferano nell'interstizio mostrano una consistente riduzione di espressione di CK14, CK5, p63, SMA e CALP mentre incrementano l'espressione di vimentina e occasionalmente mostrano positività per proteine normalmente coinvolte nella formazione di tessuto osseo e cartilagineo (proteina morfogenetica ossea-6 e condromodulina-I). Un'ulteriore conferma dell'origine mioepiteliale degli elementi mesenchimali è il fatto che talvolta alcuni condrociti esprimono ancora CK14, CK5, p63, SMA e CALP) (Destexhe *et al.*, 1993; Griffey *et al.*, 1993; Gärtner *et al.*, 1999; Tateyama *et al.*, 2001; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2002; Gama *et al.*, 2003; Kawabata *et al.*, 2005; Ramalho *et al.*, 2006; Bertagnolli *et al.*, 2009).

I dati di espressione della ghiandola mammaria sana del cane riportati in Tabella 3 ricalcano quanto descritto anche per il tessuto mammario della donna (Abd El-Rehim *et al.*, 2004; Polyak & Hu, 2005; Reis-Filho & Tutt, 2008). È interessante però sottolineare che, di recente, le evidenze sempre maggiori a sostegno dell'esistenza di elementi staminali adulti in sede mammaria hanno spinto alcuni autori ad approfondire l'espressione dei marcatori di differenziazione con tecniche immunoistochimiche e di immunofluorescenza in doppio (“*double labeling*”) che permettono di evidenziare i fenomeni di co-espressione proteica. Da questi studi è emerso un concetto biologico nuovo che prevede un **modello gerarchico di differenziazione** delle cellule della ghiandola mammaria umana (Figura 2). Secondo tale modello nella ghiandola è presente un piccolo pool (< 5%) di **elementi staminali adulti** (+

solo per CK5/CK14), luminali e basali, in grado di dare origine sia alle cellule mioepiteliali ben differenziate (+ solo per SMA/CALP) che a quelle epiteliali luminali ghiandolari con funzione secretoria (+ solo per CK8/CK18/CK19). Questa differenziazione avviene attraverso cellule ibride intermedie (“*transitory/intermediary cells*”) della linea mioepiteliale (CK5/CK14/SMA/CALP +) a localizzazione basale e della linea ghiandolare (CK5/CK14/CK8/CK18/CK19 +) a localizzazione luminale (Böcker *et al.*, 2002; Boecker & Buerger, 2003; Bánkfalvi *et al.*, 2004).

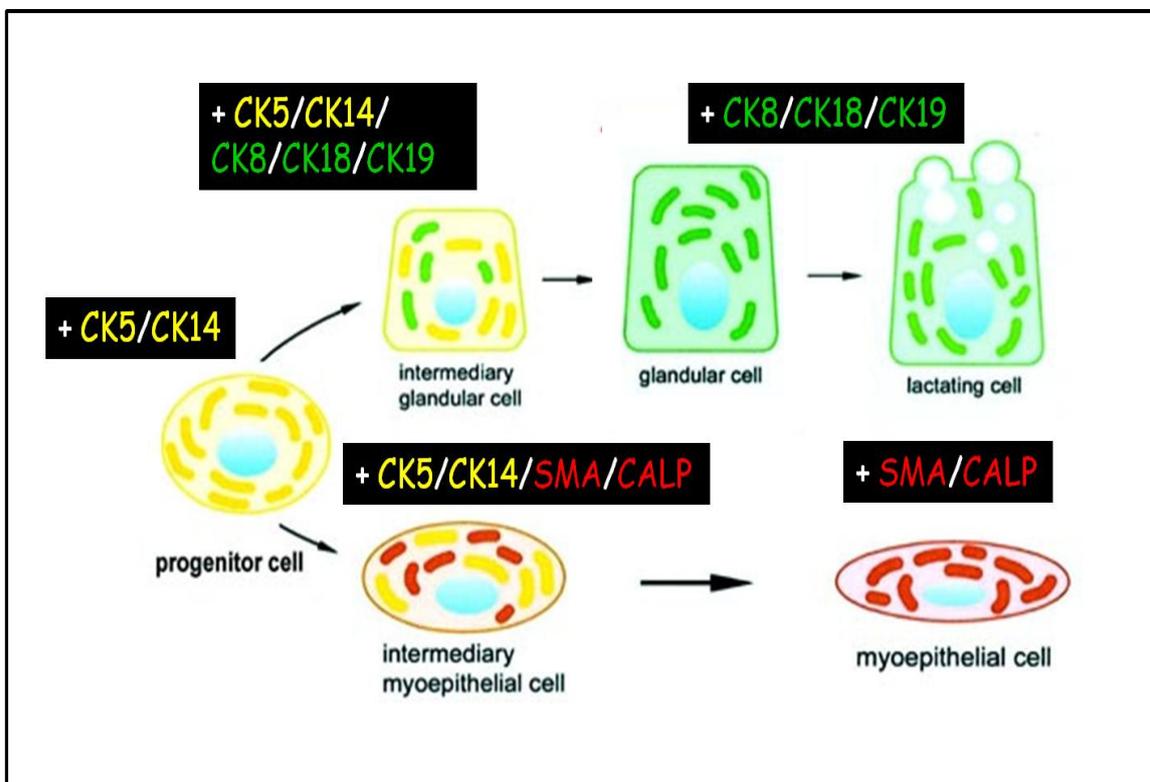


Figura 2. Modello gerarchico di differenziazione delle cellule della ghiandola mammaria umana (da Boecker & Buerger, 2003, *modificata*).

Questo modello è stato utilizzato per spiegare i diversi pattern di espressione delle CK nei carcinomi mammari umani. Sembra i carcinomi della donna mostrino nella maggior parte dei casi (> 90%) un fenotipo ghiandolare puro (+ esclusivamente per CK8/CK18/CK19) o occasionalmente ghiandolare poco differenziato (+ per CK5/CK14/CK8/CK18/CK19). Sono

invece decisamente più rari i carcinomi con fenotipo staminale puro (+ solo per CK5/CK14) o mioepiteliale più o meno differenziato (+ per CK5/CK14/SMA/CALP e + solo per SMA/CALP) (Böcker *et al.*, 2002; Boecker & Buerger, 2003).

Oltre al fenotipo cellulare, vi sono altri aspetti del tumore che l'esame immunohistochimico permette di esaminare, tra questi la **proliferazione** e la **crescita delle cellule neoplastiche**.

Lo studio dell'attività proliferativa viene generalmente affrontato mediante impiego di un anticorpo monoclonale (MIB-1) diretto contro l'antigene **Ki-67**. Il Ki-67 è una proteina nucleare altamente sensibile alle proteasi costituita dall'assemblamento di 2 catene polipeptidiche con peso molecolare rispettivo di 345 e 395 kDa. Questo eterodimero è espresso nei nuclei delle cellule ciclanti in tutte le fasi del ciclo, mentre è assente nelle cellule a riposo che entrano nel ciclo passando dalla fase G0 alla fase iniziale di G1 (Castagnaro *et al.*, 1998). Essendo espressa in tutte le fasi del ciclo cellulare, ad eccezione di G0 e G1, può considerarsi una proteina associata alla proliferazione cellulare in grado di rappresentare un *marker* della frazione in crescita cellulare di una determinata popolazione. Si consideri che nella donna l'espressione di Ki-67 è ritenuta un fattore prognostico per la sopravvivenza e la recrudescenza della lesione e viene per questo utilizzata per discriminare sottogruppi prognostici di carcinoma mammario precoce con linfonodo "negativo" (Urriticoechea *et al.*, 2005). Nel cane si è notata una maggior espressione di Ki-67 nei tumori mammari maligni rispetto alle iperplasie/tumori benigni. Elevati livelli di Ki-67 si riscontrano nel cane in tumori mammari di elevate dimensioni, con tendenza alla metastatizzazione e associati a tempi di sopravvivenza brevi (Klopfleisch *et al.*, 2010).

Nel 30% circa dei carcinomi mammari della donna la principale via di segnale responsabile della crescita e della sopravvivenza delle cellule tumorali è quella che vede coinvolto il recettore transmembranario ad attività tirosin chinasi **HER-2** (Selvarayan *et al.*,

2004). Tale recettore sembra non avere un ligando specifico, ma promuovere e stabilizzare la dimerizzazione e quindi l'attivazione degli altri recettori della famiglia HER (recettori per i fattori di crescita) favorendo così la divisione cellulare (Casalini & Iorio, 2004). In diversi tumori umani si è riscontrata una sovraespressione di HER-2, generalmente come conseguenza di fenomeni di amplificazione genica. La sovraespressione del recettore fa sì che le cellule cancerose abbiano una risposta esagerata in presenza di normali livelli di fattori di crescita (Robbins & Cotran, 2010). Oltre a stimolare la crescita tumorale HER-2 sembra anche contribuire all'acquisizione di un fenotipo invasivo e metastatico, attraverso l'*up-regulation* di fattori angiogenetici come il fattore di crescita endoteliale vascolare-C (VEGF-C) e l'angiopoietina-2 e attraverso la stimolazione della produzione di metalloproteasi (MMP) della matrice come MMP-9 e MMP-1 (Niu and Carter, 2007; Park *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). La sovraespressione del recettore HER-2 nelle donne affette da carcinoma mammario è quindi considerata un importante fattore prognostico negativo. In aggiunta, vi sono anche implicazioni terapeutiche perché tumori che presentano una sovraespressione di HER-2 sono resistenti alle terapie ormonali e rispondono bene solo ad un trattamento specifico che prevede somministrazione endovenosa di un anticorpo monoclonale (Herceptin®, Trastuzumab) in grado di bloccare il recettore HER-2 (Leong & Leong, 2006).

Nel cane alcuni studi hanno indagato la sovraespressione di HER-2 a livello mammario e hanno dimostrato che questa è presente in una certa percentuale, variabile a seconda dello studio, sia dei tumori maligni che di quelli benigni. Il significato biologico di questo reperto e la valenza prognostica dello studio di questo recettore nel cane rimangono oggetto di discussione (Gama *et al.*, 2008a; Hsu *et al.*, 2009 Kim *et al.*, 2010; Mouser *et al.*, 2010).

2. SCOPI

Questo lavoro vuole rappresentare un dettagliato studio morfologico e di approfondimento immunohistochimico del tumore mammario del cane a **fini classificativi**, di **indagine epidemiologica** e **prognostica**. Gli obiettivi principali del lavoro possono essere così riassunti:

- Elaborazione di una nuova dettagliata classificazione del tumore mammario del cane basata su criteri morfologici precisi e standardizzati.
- Valutazione della rilevanza prognostica di questa nuova classificazione e di altri parametri istopatologici quali l'estensione ai margini di escissione, il grado di malignità, l'attività mitotica tumorale, la crescita infiltrante, la presenza di pattern micropapillare e il rinvenimento di “*vasculogenic mimicry*”.
- Comparazione dell'efficienza predittiva di due diversi sistemi per la determinazione del grado istologico di malignità.
- Evidenziazione di eventuali relazioni tra gli aspetti morfologici e le informazioni anamnestiche, di segnalamento e di *follow-up*.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Organizzazione in fasi del progetto di dottorato

Il presente progetto di dottorato è stato articolato in 2 fasi distinte (Fase 1 e Fase 2), parzialmente sovrapposte da un punto di vista temporale, schematizzate in Figura 3. In Fase 1 si sono definiti criteri morfologici standardizzati per classificare le lesioni mammarie del cane ed è stato raccolto un elevato numero di campioni di tessuto mammario canino con associate informazioni segnaletiche e di *follow-up*. In Fase 2, applicando i criteri morfologici standardizzati sui campioni raccolti e mettendo i risultati ottenuti in relazione ad altre specifiche valutazioni morfologiche, ai dati segnaletici e di *follow-up* è stato possibile elaborare tre distinti studi (studio classificativo-epidemiologico, studio prognostico A e studio prognostico B). Nell'ambito dello studio classificativo-epidemiologico e dello studio prognostico B si sono utilizzate alcune analisi immunohistochimiche di supporto e approfondimento.

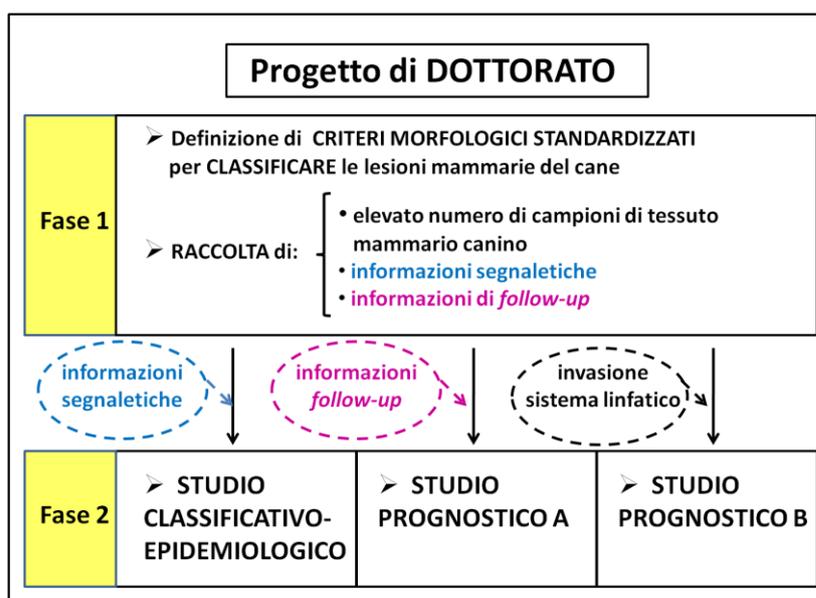


Figura 3. Fasi in cui è stato articolato il progetto di dottorato.

3.2 Fase 1 del progetto di dottorato

➤ **Definizione di criteri morfologici standardizzati per classificare le lesioni mammarie del cane.**

Questo progetto di dottorato si inserisce all'interno di un più ampio studio classificativo delle neoplasie mammarie del cane e del gatto frutto di una collaborazione tra l'Università di Padova (Facoltà di Medicina Veterinaria), l'*Universidad Complutense de Madrid (Facultad de Veterinaria)* e la *University of Pennsylvania (School of Veterinary Medicine)*. Da anni partecipano attivamente a questa collaborazione patologi con ampia esperienza diagnostica e di ricerca nell'ambito delle neoplasie mammarie degli animali domestici (Prof. Massimo Castagnaro, Prof.ssa Valentina Zappulli, Prof.ssa Laura Peña e Prof. Michael Goldschmidt). Nei tre anni di dottorato, e in particolare durante un soggiorno-studio di 5 mesi presso la *University of Pennsylvania (School of Veterinary Medicine)* ho potuto partecipare attivamente a questa collaborazione andando ad individuare criteri morfologici standardizzati per classificare le neoplasie mammarie del cane. Per la distinzione tra tumori benigni e maligni si è deciso di adottare criteri già descritti in letteratura quali l'attività mitotica, il pleomorfismo cellulare e nucleare, la presenza di aree multifocali di necrosi e la pluristratificazione degli elementi neoplastici (Misdorp, 2002). Rispetto all'attività mitotica, in particolare nei casi *borderline*, si è deciso di utilizzare un *cut-off* di 3 mitosi su 10 campi a ingrandimento 40X, al di sopra del quale la lesione tumorale è stata considerata maligna. Questo *cut-off*, già impiegato come indice di malignità per le neoplasie melanocitarie del cane, è stato scelto seguendo i suggerimenti della Prof.ssa Laura Peña che ha maturato una particolare esperienza in ambito di studi prognostici sulle neoplasie mammarie del cane.

Per la caratterizzazione morfologica delle lesioni mammarie si è deciso di fare riferimento alla classificazione WHO illustrata nell'introduzione. A partire da questa si è proceduto approfondendo alcuni aspetti morfologici. Questi hanno riguardato la localizzazione (ad es., evidente associazione con parete duttale), l'organizzazione e alcune caratteristiche specifiche (ad es., differenziazione squamosa) della componente epiteliale luminale. Inoltre si è prestata particolare attenzione all'eventuale presenza nei tumori di una componente interstiziale riferibile a mioepitelio e a suoi aspetti caratteristici, soprattutto in riferimento ad eventuali segni di pleomorfismo e malignità. Tali valutazioni sono state effettuate per tutte le forme tumorali sia benigne che maligne e anche le forme iperplastiche/displastiche sono state attentamente caratterizzate e classificate.

Sulla base di queste rielaborazioni è stata stilata una “**Classificazione WHO-modificata**” che viene di seguito schematicamente riportata.

Neoplasie epiteliali maligne (carcinomi):

- **Carcinoma non infiltrante (*in situ*)**: neoplasia epiteliale con caratteristiche istologiche di malignità che non invade la membrana basale della struttura preesistente (da classificazione WHO). Generalmente si presenta come un piccolo nodulo, ben demarcato, che cresce all'interno di un lobulo ghiandolare iperplastico senza invadere il tessuto circostante. Le cellule presentano organizzazione solida e/o tubulare, hanno elevato rapporto nucleo/citoplasma e si evidenziano occasionali mitosi. Nella classificazione WHO è descritto l'aspetto “*comedo*” (pattern solido con necrosi centrale). Questo aspetto, molto frequente nella donna, non si evidenzia però quasi mai nel cane nelle forme *in situ*, ma è invece più frequente in forme di carcinoma molto estese ed infiltranti che sono state quindi considerate separatamente (vedi carcinoma comedonico). Per la stessa ragione si è

deciso di considerare anche il carcinoma con pattern cribriforme un'entità morfologica a sé stante (vedi carcinoma cribriforme).

- **Carcinoma semplice**: carcinoma composto unicamente da cellule epiteliali luminali (da classificazione WHO con modifiche). Rispetto alla definizione originale della WHO vengono escluse le forme composte esclusivamente da cellule mioepiteliali maligne che vengono considerate separatamente (vedi mioepitelioma maligno). A seconda del pattern di distribuzione delle cellule epiteliali luminali si distinguono:
 - **Carcinoma tubulare**: cellule disposte in tubuli (da classificazione WHO).
 - **Carcinoma tubulo-papillare**: cellule disposte in tubuli e papille (da classificazione WHO).
 - **Carcinoma cistico-papillare**: cellule disposte in papille che si estendono all'interno di un lume tubulare cistico (da classificazione WHO).
 - **Carcinoma cribriforme**: cellule disposte in aree solide con presenza di numerose piccole aperture (pattern "a setaccio") (da classificazione WHO). È una forma molto frequente nel gatto.
 - **Carcinoma solido**: cellule disposte in nidi, cordoni e aree lobulari solide (da classificazione WHO).
- **Carcinoma micropapillare invasivo**: carcinoma con più del 50% delle cellule tumorali organizzate in piccoli aggregati o papille privi di asse fibrovascolare e spesso circondati da lacune stromali vuote. Le cellule, di forma cuboidale/poligonale, presentano moderato citoplasma intensamente eosinofilo e nucleoli prominenti (Cassali *et al.*, 2002; Gama *et al.*, 2008b).
- **Carcinoma comedonico**: carcinoma molto esteso, spesso multilobulato ed infiltrante, caratterizzato da cellule disposte in ampi lobuli separati da stroma connettivale e all'interno dei quali si riconoscono aree centrali di necrosi che generalmente coinvolgono

più del 50% della popolazione neoplastica. Le aree necrotiche sono caratterizzate da accumulo di abbondante materiale amorfo eosinofilo frammisto a detriti cellulari, neutrofilo degenerati e macrofagi schiumosi. Le cellule neoplastiche non necrotiche possono presentare pattern solido e occasionalmente tubulare o tubulo-papillare.

- **Carcinoma anaplastico**: carcinoma altamente infiltrante composto da cellule epiteliali pleomorfe, singole o in piccole aggregati, con nuclei bizzarri, talvolta multipli (da classificazione WHO).
- **Carcinoma in adenoma complesso/tumore misto benigno**: tumore in cui si rinvengono foci distinti di cellule epiteliali maligne (carcinoma) all'interno di un adenoma complesso (carcinoma in adenoma complesso) o di un tumore misto benigno (carcinoma in tumore misto benigno). Le aree benigne sono chiaramente evidenti (da classificazione WHO).
- **Carcinoma complesso**: tumore composto da cellule epiteliali luminali maligne e da cellule mioepiteliali benigne (da classificazione WHO con modifiche). Rispetto alla definizione WHO originale viene qui specificamente sottolineata la natura benigna delle cellule mioepiteliali che appaiono di forma fusata/stellata e presentano minimi aspetti di anisocitosi ed anisocariosi con rare o assenti figure mitotiche. Le cellule mioepiteliali sono organizzate in fasci e vortici interstiziali e sono spesso associate a depositi di matrice extracellulare lievemente basofila. Le cellule epiteliali luminali maligne possono invece presentare diversi pattern di distribuzione (solido, tubulare, tubulo-papillare).
- **Carcinoma e mioepitelioma maligno**: tumore in cui sia la componente epiteliale luminale che quella mioepiteliale sono maligne. Rispetto ad un carcinoma complesso, le cellule identificabili come mioepiteliali possono mostrare aspetti morfologici variabili e in ogni caso presentano anisocitosi ed anisocariosi più spiccate e un'attività mitotica più intensa. Le cellule epiteliali luminali maligne possono invece presentare diversi pattern di distribuzione (solido, tubulare, tubulo-papillare).

- **Carcinoma misto**: tumore in cui si riviene una componente epiteliale luminale diffusamente maligna (carcinoma) associata ad una componente mioepiteliale benigna con aree di differenziazione cartilaginea e/o ossea. Rispetto al carcinoma in tumore misto benigno non sono evidenti aree in cui la componente epiteliale luminale conserva caratteristiche di benignità.
- **Carcinoma duttale**: questa è la controparte maligna dell'adenoma duttale (adenoma basaloide). Il carcinoma duttale é composto da cellule organizzate in formazioni simil-cordonali e papillifere irregolari in cui è possibile rilevare occasionalmente la presenza di due file di cellule (luminale e basale). Occasionalmente tra i cordoni si osservano spaccature lineariformi. È frequente inoltre riscontrare aree luminali in differenziazione squamosa. Il termine carcinoma duttale è stato scelto per i numerosi aspetti morfologici che questo tumore ha in comune con il carcinoma duttale delle ghiandole apocrine del cane per il quale si ipotizza un'origine dalle strutture duttali (Gross *et al.*, 2005). Questo tumore non ha invece nulla a che vedere con il carcinoma duttale della mammella umana, che è invece un'entità che può presentare aspetti morfologici molto eterogenei (Robbins & Cotran, 2009).
- **Carcinoma papillare intraduttale**: controparte maligna dell'adenoma papillare intraduttale (papilloma duttale). La denominazione “papillare intraduttale” deriva dalla presenza di ampie proiezioni papillifere che prendono origine dalla parete di una o più strutture duttali ectasiche e appaiono esofitiche nel lume duttale. Tali papille sono rivestite da cellule epiteliali maligne con occasionali aree multifocali luminali di differenziazione squamosa. Nello stroma connettivale di supporto si possono occasionalmente rilevare aree di minima proliferazione mioepiteliale con caratteristiche di benignità.

Neoplasie maligne-tipi speciali:

- **Carcinoma a cellule squamose:** carcinoma composto da isole, cordoni e nidi di cellule squamose maligne (da classificazione WHO). È morfologicamente sovrapponibile al carcinoma squamoso cutaneo (Gross *et al.*, 2005).
- **Carcinoma adenosquamoso:** carcinoma a cellule squamose (vedi sopra) che presenta però in concomitanza aree indicative di un'origine ghiandolare (formazione di tubuli/papille) (da classificazione WHO).
- **Carcinoma mucinoso:** carcinoma caratterizzato da abbondante produzione di mucina (da classificazione WHO). Le cellule neoplastiche possono essere organizzate in tubuli e nidi e il materiale mucinoso è mucicarminio e PAS-diastasi positivo. Questa neoplasia deve essere differenziata dal carcinoma complesso con abbondante presenza di matrice extracellulare basofila (Brunetti *et al.*, 2003).
- **Carcinoma con cellule ricche in lipidi (lipid-rich):** carcinoma composto da cellule con citoplasma ricco in lipidi neutri (da classificazione WHO). Le cellule hanno organizzazione prevalentemente solida e presentano citoplasma abbondante contenente vacuoli multipli di piccole dimensioni o un vacuolo singolo ampio con dislocazione periferica del nucleo.
- **Tumori a cellule fusate:**
 - **Mioepitelioma maligno:** tumore costituito esclusivamente da cellule mioepiteliali maligne. Gli aspetti morfologici sono analoghi a quelli descritti per il carcinoma e mioepitelioma maligno, eccetto che per l'assenza in questo caso di elementi epiteliali luminali.

- **Carcinoma squamoso a cellule fusate**: carcinoma composto da cellule squamose di forma fusata. È morfologicamente sovrapponibile al carcinoma squamoso cutaneo a cellule fusate (Gross *et al.*, 2005).
- **Carcinoma-variante a cellule fusate**: carcinoma composto da cellule prevalentemente di forma fusata organizzate in isole e nidi (da classificazione WHO).

Neoplasie mesenchimali maligne (sarcomi): (da classificazione WHO)

- **Osteosarcoma**
- **Fibrosarcoma**
- **Condrosarcoma**
- **Emangiosarcoma**
- **Atri sarcomi**

Carcinosarcoma: tumore composto da cellule epiteliali luminali maligne e da cellule mesenchimali maligne in variabili proporzioni (da classificazione WHO). Generalmente la componente mesenchimale maligna è riferibile ad un condrosarcoma, ad un fibrosarcoma o ad un osteosarcoma.

Tumori benigni:

- **Adenoma semplice**: neoplasia benigna composta unicamente da cellule epiteliali luminali, con pattern di distribuzione tubulare o tubulo-papillare (da classificazione WHO con modifiche). Rispetto alla definizione originale della WHO vengono escluse le forme composte esclusivamente da cellule mioepiteliali benigne che vengono considerate separatamente (vedi mioepitelioma benigno).

- **Adenoma papillare intraduttale (papilloma duttale)**: tumore benigno composto da papille intraduttali con asse fibrovascolare e con aree luminali di differenziazione squamosa. Come nel caso del carcinoma papillare intraduttale, nello stroma connettivale di supporto si possono occasionalmente rilevare aree di minima proliferazione mioepiteliale con caratteristiche di benignità (da classificazione WHO con modifiche).
- **Adenoma duttale (adenoma basaloide)**: tumore benigno caratterizzato da cordoni intersecantisi a formare spaccature lineariformi e costituiti da cellule disposte su due file (luminale e basale). È frequente inoltre riscontrare aree luminali in differenziazione squamosa (da classificazione WHO). Questo tumore è morfologicamente sovrapponibile all'adenoma duttale delle ghiandole apocrine (Gross *et al.*, 2005).
- **Fibroadenoma**: tumore benigno composto da cellule epiteliali luminali organizzate in strutture tubulari allungate che sono circondate da abbondante stroma connettivale lasso, spesso edematoso e talvolta contenente occasionali elementi mioepiteliali (da classificazione WHO).
- **Mioepitelioma**: raro tumore composto esclusivamente da cellule mioepiteliali con caratteristiche di benignità, organizzate in corti fasci e associate a matrice lievemente basofila.
- **Adenoma complesso**: tumore composto da una componente epiteliale luminale e da una mioepiteliale, entrambe benigne (da classificazione WHO).
- **Tumore misto benigno**: tumore benigno composto da una componente epiteliale luminale, da una componente mioepiteliale e da tessuto mesenchimale (cartilagine e/o osso, raramente tessuto adiposo) (da classificazione WHO).

Iperplasie/displasie:

- **Ectasia duttale:** dilatazione dei dotti interlobulari con possibile accumulo nel lume di secreto frammisto a detriti cellulari, a macrofagi schiumosi e a cristalli di colesterolo (da classificazione WHO).
- **Iperplasia lobulare (adenosi):** proliferazione intralobulare non neoplastica caratterizzata da incremento del numero dei dotti intralobulari e degli alveoli. Le cellule che rivestono tali dotti e alveoli non presentano generalmente significativi aspetti di atipia (da classificazione WHO).
 - **Iperplasia lobulare classica:** (vedi sopra)
 - **Iperplasia lobulare con attività secernente:** le cellule che tappezzano gli alveoli sono colonnari con citoplasma ampio e vacuolizzato. Nel lume alveolare si rileva presenza di materiale amorfo eosinofilo riferibile a secreto.
 - **Iperplasia lobulare con fibrosi:** si evidenzia incremento del tessuto connettivo stromale tra i lobuli iperplastici.
 - **Iperplasia lobulare con aspetti di atipia:** all'interno del lobulo iperplastico si rilevano alcuni aspetti di atipia quali presenza di mitosi, minima pluristratificazione delle cellule, ipercromasia nucleare, e lievi anisocitosi ed anisocariosi.
- **Epiteliosi:** densa proliferazione di cellule epiteliali dei dotti intralobulari che vanno a riempire il lume duttale. Queste cellule presentano nuclei ipercromatici, scarso citoplasma e lieve pleomorfismo (da classificazione WHO con modifiche). L'epiteliosi viene differenziata da forme di carcinoma *in situ* per l'anisocitosi e l'anisocariosi meno spiccate.

- **Papillomatosi (iperplasia duttale)**: proliferazione di cellule epiteliali dei dotti interlobulari con formazione di piccole papille prive di asse fibrovascolare (da classificazione WHO con modifiche). La papillomatosi, sulla base del ridotto pleomorfismo cellulare, deve essere differenziata da aree di carcinoma micropapillare invasivo.
 - **Cambiamento fibroadenomatoso**: lesione morfologicamente simile al fibroadenoma che si sviluppa in seguito a stimolazione progestinica esogena o endogena, in particolare negli animali giovani. È una condizione molto rara nel cane, mentre si sviluppa con una certa frequenza nel gatto (da classificazione WHO).
 - **Ginecomastia**: ingrossamento delle ghiandole mammarie nei cani maschi, spesso in associazione a sertoliomi testicolari. Istologicamente si presenta come un quadro di iperplasia lobulare ed ectasia duttale (da classificazione WHO).
- **Raccolta di un elevato numero di campioni di tessuto mammario canino, di informazioni segnaletiche e di *follow-up*.**

Per testare questa “Classificazione WHO-modificata” si è deciso di analizzare un elevato numero di campioni di tessuto mammario canino. Sono stati quindi raccolti in tutto **2143** campioni provenienti da 2143 cani femmina sottoposti a mastectomia in seguito ad evidenziazione clinica di una o più lesioni nodulari a carico del parenchima mammario. Tutti i campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, sezionati e inclusi in paraffina. Sezioni di 4 micron sono state successivamente colorate con ematossilina-eosina secondo procedure istologiche standard. Da ciascun campione sono state ricavate e quindi valutate una o più sezioni istologiche a seconda della quantità di tessuto mammario inviato e del numero di lesioni identificate macroscopicamente.

I campioni raccolti erano riconducibili a due gruppi: gruppo A e gruppo B.

Il **gruppo A** era costituito da **1898** campioni di tessuto mammario, di cui 515 comprendevano anche tessuto del linfonodo regionale, inviati al Servizio Diagnostico di Istopatologia della Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova da diverse cliniche e ambulatori veterinari presenti sul territorio italiano. Di questi, 1805 sono stati raccolti durante i tre anni di dottorato (nello specifico da gennaio 2008 ad agosto 2010) mentre 93 erano campioni d'archivio riferibili ad un intervallo di tempo compreso tra febbraio 2005 e settembre 2007. Mediante compilazione da parte dei veterinari clinici di un modulo per la raccolta dei dati segnaletici è stato possibile raccogliere dati relativi all'**età** e all'eventuale **sterilizzazione** dei 1898 cani da cui i campioni erano stati prelevati. In base all'età i soggetti sono stati classificati in 9 gruppi: età5 (età pari o inferiore a 5 anni), età6 (età pari a 6 anni), età7 (età pari a 7 anni), età8 (età pari a 8 anni), età9 (età pari a 9 anni), età10 (età pari a 10 anni), età11 (età pari a 11 anni), età12 (età pari a 12 anni) ed età13 (età pari o superiore a 13 anni). Per 1761 animali si sono raccolte, in aggiunta, informazioni relative alla **razza**. Gli animali sono stati distinti in soggetti di razza pura e meticci. I soggetti di razza pura sono stati ulteriormente suddivisi nei 10 gruppi ufficiali di razza, riportati in Tabella 4, secondo gli *standards* della Federazione Cinofila Internazionale (FCI) (FCI, 2008).

Tabella 4. Gruppi ufficiali di razza secondo la Federazione Cinofila Internazionale (FCI, 2008).

Gruppi di razza
Gruppo 1: Cani da pastore e bovani, esclusi i bovani svizzeri
Gruppo 2: Cani di tipo pinscher, schnauzer, molossoidi e cani bovani svizzeri
Gruppo 3: Terrier
Gruppo 4: Bassotti
Gruppo 5: Cani tipo spitz e tipo primitivo
Gruppo 6: Segugi e cani per pista di sangue
Gruppo 7: Cani da ferma
Gruppo 8: Cani da riporto, da cerca e da acqua
Gruppo 9: Cani da compagnia
Gruppo 10: Levrieri

In aggiunta, mediante interviste telefoniche ai veterinari clinici ad intervalli di circa 4-6 mesi, si sono ricavate informazioni di *follow-up* per un sottogruppo di **229** cani (che chiameremo *Afu*) monitorati per un minimo di 12 mesi fino ad un massimo di 31 mesi post-intervento chirurgico. Le informazioni richieste erano relative all'eventuale insorgenza di recidive e di metastasi a distanza e all'eventuale decesso del soggetto.

Il **gruppo B** era invece costituito da **245** campioni di tessuto mammario canino raccolti durante 5 mesi di soggiorno-studio presso il *Laboratory of Pathology and Toxicology* della *University of Pennsylvania (School of Veterinary Medicine)*, Philadelphia, USA. Questi campioni sono stati appositamente selezionati per uno studio retrospettivo volto ad identificare le caratteristiche morfologiche dei carcinomi mammari predittive della tendenza alla diffusione metastatica attraverso il sistema linfatico. La selezione dei campioni è stata quindi effettuata ricercando nel *database* del laboratorio tutti i casi, da gennaio 2000 a dicembre 2009, in cui in un campione di tessuto mammario canino era stato diagnosticato un carcinoma mammario e il campione includeva anche tessuto linfonodale per la ricerca di metastasi (127 campioni) o vi erano evidenze istologiche di invasione dei vasi linfatici (118 campioni).

3.3 Fase 2 del progetto di dottorato

In questa fase si sono elaborati tre diversi studi: studio classificativo-epidemiologico, studio prognostico A e studio prognostico B.

3.3.1 Studio classificativo-epidemiologico

3.3.1.1 Istopatologia

Tale studio è stato condotto sui **1898** campioni del **gruppo A** per indagare, a fini epidemiologici, le relazioni tra gli aspetti morfologici e i dati anamnestici. Mediante valutazione al microscopio ottico le lesioni presenti nei 1898 campioni sono state analizzate e classificate secondo i criteri della “**Classificazione WHO-modificata**”. È stata inoltre riportata l’eventuale presenza in sezione di segni di invasione del sistema linfatico (invasione vascolare linfatica o metastasi linfonodali).

Di ogni sottotipo tumorale diagnosticato in ciascun soggetto (campione) è stata inoltre valutata la **distribuzione istologica**, ossia se la lesione era **focale** (un solo nodulo di un certo sottotipo tumorale) o **multifocale** (più noduli distinti dello stesso sottotipo tumorale).

Per tutti i carcinomi (eccetto il carcinoma *in situ* e il carcinoma squamoso) è stato inoltre calcolato il **grado istologico di malignità** utilizzando il sistema di *grading* di Clemente e collaboratori, recentemente proposto in letteratura (Clemente *et al.*, 2010) e schematizzato in Tabella 5. In caso di presenza nel campione di più noduli dello stesso sottotipo di carcinoma (distribuzione multifocale), il grado è stato calcolato separatamente per ciascuno dei noduli ed è stato infine tenuto in considerazione il grado più elevato.

Tabella 5. Sistema per il calcolo del *grading* istologico di malignità di Clemente e collaboratori (Clemente *et al.*, 2010).

Formazione tubuli	Pleomorfismo nucleare	Mitosi in 10 campi selezionati* al 40X	Punteggio
> 75%	Lieve	0-9	1
10-75%	Moderato	9-19	2
< 10%	Marcato	> 19%	3
Valutare ogni caratteristica e sommare i punteggi per determinare il grado istologico di malignità.			
	Somma punteggi	Grado	
	3-5	I	
	6-7	II	
	8-9	III	

* campi selezionati = aree periferiche del tumore o a più intensa attività mitotica.

In aggiunta, per ogni tipo di tumore diagnosticato in ciascun soggetto (campione) è stato misurato il **diametro** (maggiore). In caso di presenza di più noduli dello stesso sottotipo tumorale nel campione (distribuzione multifocale) è stato considerato il diametro del nodulo più grande. Nella maggior parte dei casi il diametro tumorale è stato misurato con un righello direttamente sul vetrino perché il nodulo era interamente compreso nella sezione istologica. Nei rari casi di noduli di dimensioni molto grandi la misurazione è stata effettuata al momento del “trimming” prima di sezionare i noduli stessi.

3.3.1.2 Immunoistochimica

Per **64** dei 1898 **campioni** sono state eseguite **analisi immunoistochimiche** per approfondire lo studio del fenotipo, dell’attività proliferativa e della crescita di 25 lesioni tumorali maligne a morfologia atipica che sono state messe a confronto con 40 lesioni tumorali appartenenti a 2

classi morfologiche note (carcinoma semplice e carcinoma complesso). Si è indagata nello specifico l'espressione dei seguenti marcatori: **CK8/18, CK14, CK5, SMA, CALP, VIM, p63, Ki-67** ed **HER-2**. Le analisi immunohistochimiche sono state effettuate su sezioni di 4 micron di spessore su vetrini portaoggetti Superfrost® utilizzando un immunocoloratore automatico BenchMark XT® (VentanaMedical System). L'immunocoloratore ha impiegato per la rivelazione l'*ultraView™ DAB (HRP)* kit, un sistema *biotina-free* basato sull'utilizzo di un multimeri complessato all'enzima perossidasi *Horseradish* che permette di identificare in modo sensibile gli anticorpi primari di topo e coniglio. Il kit era costituito da cinque componenti: *ultraView™ Universal DAB Inhibitor* (che impedisce un'aspecifica perossidazione della DAB), *ultraView™ Universal DAB HRP Multimer* (multimeri biotina free complessato con la perossidasi *Horse-raddish*), *ultraView™ Universal DAB Chromogen* (diaminobenzidina), *ultraView™ Universal DAB H2O2* (perossido di idrogeno che attiva l'azione della perossidasi che agisce sulla diaminobenzidina, la quale funge da substrato e determina la formazione di un prodotto finale marrone insolubile in alcool) e *ultraView™ Universal DAB Copper*. Durante tutta la procedura i vetrini erano ricoperti da una soluzione oleosa per creare una camera umida sul tessuto; i reagenti sono stati distribuiti automaticamente, fatta eccezione per la titolazione dell'anticorpo primario che è stato dispensato manualmente (100 microlitri di soluzione con diluizione specifica a seconda del marcatore indagato). La controcolorazione è stata effettuata, sempre in modo automatizzato, con ematossilina di Mayer per 4 minuti. Al termine della corsa i vetrini sono stati accuratamente lavati in acqua e sapone per eliminare la soluzione oleosa e successivamente disidratati attraverso passaggi di due minuti ciascuno in soluzioni ascendenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100) e in xilene; infine i vetrini sono stati montati con *Eukitt®* (Bio-Optica). Gli anticorpi e le fasi principali dei protocolli impiegati sono riassunti in Tabella 6. In Tabella 6 sono anche riportati, per ciascun anticorpo, i controlli positivi utilizzati. Si sono inoltre

ottenuti controlli negativi omettendo la soluzione di anticorpo primario, sostituita da 100 microlitri del diluente utilizzato per gli anticorpi stessi (*Antibody diluent*, Ventana Medical System).

La **valutazione della positività** immunohistochimica per ciascuna lesione tumorale è stata effettuata al microscopio ottico. Nel caso di tumori composti da due popolazioni cellulari sono stati indicati due distinti valori di espressione riferiti alle due diverse componenti cellulari tumorali. Nel caso di CK8/18, CK14, CK5, SMA, CALP e VIM è stata quantificata la percentuale di cellule che presentavano citoplasma marcato. A questo scopo si sono contate su almeno 10 campi microscopici all'obiettivo 40X, 100 cellule per campo, per un totale di 1000 cellule. Con modalità analoghe sono state determinate le percentuali di positività nucleare per Ki-67 e per p63. Per tutti questi marcatori è stata inoltre espressa una valutazione soggettiva relativa all'intensità (debole, moderata, intensa) della colorazione. La positività per l'anticorpo anti-HER-2 è stata valutata invece osservando la colorazione delle membrane cellulari. Anche in questo caso si sono contate almeno 1000 cellule su 10 campi microscopici all'obiettivo 40X. Si è identificata la colorazione di membrana come completa o parziale e come intensa o debole-moderata e il sistema di punteggio che è stato impiegato (Tabella 7) è quello oggi utilizzato di routine in medicina umana (Thomson *et al.*, 2001). I punteggi 0 e 1+ sono stati considerati negativi, mentre 2+ e 3+ positivi, ossia indicativi di una sovraespressione del recettore (Thomson *et al.*, 2001).

Tabella 6. Descrizione delle fasi principali dei protocolli immunocistochimici adottati e controlli positivi per ciascun anticorpo.

Marcatore	Incubazione dell'anticorpo			Smascheramento	Controllo positivo
	Anticorpo	Diluizione	Tempo e temperatura		
CK 8/18	Cytokeratin (8/18) liquid mouse monoclonal antibody NCL-L-5D3 Novocastra	1 : 30	42 gradi per 24 minuti	Enzima per 8 minuti	Epitelio luminale delle ghiandole sudoripare apocrine (controllo interno)
CK14	Cytokeratin 14 mouse monoclonal antibody NCL-LL002 Novocastra	1 : 20	42 gradi per 20 minuti	95 gradi per 30 minuti	Epidermide (controllo interno)
CK5	Cytokeratin 5 mouse monoclonal antibody NCL-CK5 Novocastra	1 : 150	42 gradi per 16 minuti	95 gradi per 30 minuti	Strati basali epidermide e follicoli piliferi (controllo interno)
SMA	Monoclonal mouse anti-human smooth muscle actin Clone 1A4 Dako	1 : 100	42 gradi per 12 minuti	Nessuno	Muscolatura liscia vasale (controllo interno)
CALP	Monoclonal mouse anti-human calponin Clone CALP Dako	1 : 200	42 gradi per 12 minuti	95 gradi per 30 minuti	Muscolatura liscia vasale (controllo interno)
VIM	Monoclonal mouse anti-vimentin Clone V9 Dako	1 : 150	42 gradi per 20 minuti	95 gradi per 30 minuti	Fibroblasti stromali (controllo interno)
p63	p63 (4A4): sc-8431 Santa Cruz Biotechnology Inc.	1 : 200	42 gradi per 20 minuti	95 gradi per 30 minuti	Strati basali epidermide (controllo interno)
Ki-67	Monoclonal mouse anti-human Ki-67 Clone MIB-1 Dako	1 : 50	42 gradi per 10 minuti	95 gradi per 30 minuti	Infiltrati linfocitari e follicoli piliferi (controllo interno)
HER-2	Polyclonal rabbit anti-human c-erbB-2 oncoprotein A0485 Dako	1 : 250	42 gradi per 36 minuti	95 gradi per 30 minuti	Carcinoma mammario umano HER-2 positivo

Tabella 7. Sistema di attribuzione del punteggio relativo all'espressione di HER-2 valutata con tecnica immunohistochimica, Hercep Test, DAKO (Thomson *et al.*, 2001).

Valutazione dell'intensità e della completezza della colorazione della membrana delle cellule tumorali.	Punteggio
La membrana non si colora oppure si colora in meno del 10% delle cellule tumorali.	0
La membrana si colora debolmente e parzialmente in più del 10% delle cellule tumorali.	1+
La membrana si colora in modo completo da debolmente a moderatamente in più del 10% delle cellule tumorali.	2+
La membrana si colora in modo completo e intenso in più del 10% delle cellule tumorali.	3+

A scopo comparativo l'espressione dei marcatori di differenziazione cellulare (CK8/18, CK14, CK5, SMA, CALP, VIM e p63) è stata indagata anche su **10 campioni aggiuntivi di tessuto mammario canino sano e/o con minime lesioni iperplastiche**. Per queste analisi si sono utilizzati i medesimi protocolli automatizzati impiegati per lo studio delle lesioni tumorali (Tabella 6). In aggiunta su questi 10 campioni di tessuto sano/lievemente iperplastico sono state effettuate anche analisi immunohistochimiche in doppio, mediante impiego dell'immunocoloratore automatico e di un apposito *software* per la **doppia colorazione**. In particolare è stata indagata simultaneamente l'espressione di: **p63 e CK14, p63 e CALP, CK14 e CALP, p63 e CK5**. La procedura in questo caso ha previsto incubazione sequenziale delle due diverse soluzioni contenenti gli anticorpi e separata rivelazione delle due reazioni mediante impiego di due kit distinti: l'*ultraView™ DAB (HRP)*, già impiegato per le analisi precedentemente descritte, e l'*ultraView™ RED (Alk Phos)*, che comprende un multimerico complessato con la fosfatasi alcalina e determina una reazione colorimetrica rossa. Gli anticorpi, le diluizioni, i parametri dell'incubazione e gli smascheramenti antigenici utilizzati per la doppia colorazione erano i medesimi dei protocolli a colorazione singola descritti in Tabella 6.

La valutazione dell'espressione nel tessuto sano/iperplastico è stata unicamente descrittiva, con riferimento alla localizzazione della positività nei vari compartimenti cellulari costituenti la ghiandola mammaria (strato epiteliale luminale, strato basale/mioepiteliale e stroma).

3.3.1.3 Elaborazioni statistiche

Sono state condotte analisi statistiche con il *software SAS (Statistical Analysis System)*. Per tali analisi sono stati raggruppati, sulla base di analogie morfologiche, alcuni sottotipi tumorali. In particolare i sarcomi sono stati raggruppati con i carcinosarcomi, i carcinomi duttali con i carcinomi papillari intraduttali, i carcinomi adenosquamosi con i carcinomi squamosi, i carcinomi semplici tubulo-papillari con i carcinomi semplici cisto-papillari, gli adenomi duttali con gli adenomi papillari intraduttali ed i mioepiteliomi con gli adenomi complessi. Si è deciso invece di non considerare l'epiteliosi all'interno del gruppo delle iperplasie/displasie, ma di analizzare questa lesione separatamente in quanto in letteratura viene ipotizzata essere preneoplastica (Misdorp, 2002; Mouser *et al.*, 2010)

Per investigare le relazioni tra le tipologie di lesione (iperplasie/displasie, epiteliosi, tumori benigni, tumori maligni e invasione del sistema linfatico), i sottotipi tumorali, la distribuzione istologica dei tumori, il grado istologico di malignità e le informazioni segnaletiche dell'animale (età, razza, sterilizzazione) sono state effettuati studi di associazione basati su tavole di frequenza e test di associazione utilizzando statistiche del Chi Quadrato, test di Mantel- Haeszel, test di Cochran-Mantel-Haeszel e test esatto di Fisher.

Mediante impiego di due modelli di regressione logistica è stato studiato il ruolo di una serie di variabili esplicative in grado di agire come fattori di rischio o di protezione in relazione alla presenza di tumori benigni e maligni nella popolazione esaminata. In questi modelli sono stati stimati i rischi relativi di diagnosi tumorale per ciascuno dei livelli della

variabili considerate esprimendoli in rapporto a categorie di riferimento (ad es., il rischio relativo di diagnosi di tumore maligno per animali sterilizzati in rapporto a quello di animali interi). Il primo modello, che ha indagato la probabilità di riscontrare tumori maligni, includeva variabili esplicative multicotomiche quali l'età (categoria di riferimento: cani di età pari o inferiore a 5 anni) e la razza (categoria di riferimento: gruppo 1) e dicotomiche quali la sterilizzazione (categoria di riferimento: animale intero), la concomitante presenza di lesioni iperplastiche/displastiche (categoria di riferimento: assenza di lesioni iperplastiche/displastiche), di epiteliosi (categoria di riferimento: assenza di epiteliosi), di tumori benigni (categoria di riferimento: assenza di tumori benigni) e di invasione del sistema linfatico (categoria di riferimento: assenza di invasione del sistema linfatico). Nel secondo modello, che stimava la probabilità di riscontrare tumori benigni, le variabili esplicative categoriche erano le stesse del modello precedente (con le medesime categorie di riferimento) e quelle dicotomiche erano la sterilizzazione (categoria di riferimento: animale intero), la concomitante presenza di lesioni iperplastiche/displastiche (categoria di riferimento: assenza di lesioni iperplastiche/displastiche), di epiteliosi (categoria di riferimento: assenza di epiteliosi) e di tumori maligni (categoria di riferimento: assenza di tumori maligni). Sono stati calcolati i rapporti di quote (*odds ratios*, OR) con un intervallo di confidenza (IC) al 95%. Rapporti di quote non significativamente diversi da 1 indicavano pari probabilità dell'evento in rapporto alla categoria di riferimento. Valori significativamente diversi da 1 indicavano minor probabilità dell'evento in rapporto alla categoria di riferimento se minori di 1, maggior probabilità dell'evento in rapporto alla categoria di riferimento se maggiori di 1.

Allo scopo di studiare diversi fattori come possibili fonti della variabilità del diametro tumorale sono state condotte analisi della varianza sulla base di due modelli lineari. Il primo prendeva in considerazione, quali fonti di variabilità del diametro tumorale, l'età, la razza, la presenza/assenza di sterilizzazione, il sottotipo tumorale e la distribuzione istologica delle

lesioni. Il secondo modello includeva le medesime variabili, con l'unica differenza che le lesioni erano distinte in benigne e maligne e non classificate per sottotipo. Per ciascuna variabile esplicativa di natura categorica sono state calcolate le medie dei minimi quadrati (medie *least-squares*).

Per ogni marcatore immunohistochimico le differenze di espressione nelle varie popolazioni tumorali dei diversi tipi di tumori sono state analizzate mediante modelli lineari. Il modello che ha studiato l'espressione di Ki-67 ha preso in considerazione, oltre alle popolazioni tumorali, anche la presenza di epiteliosi e di invasione del sistema linfatico come possibili fonti della variabilità di espressione di questo marcatore. Sono state calcolate le medie dei minimi quadrati. Per tutte le analisi statistiche, la significatività utilizzata è stata pari a 5%.

3.3.2 Studio prognostico A

3.3.2.1 Istopatologia

Tale studio è stato condotto sui **229** campioni del **gruppo Afu** per indagare le relazioni tra gli aspetti morfologici, le informazioni segnaletiche e il *follow-up*.

Questi campioni erano stati inclusi nello studio classificativo-epidemiologico per cui erano disponibili le informazioni segnaletiche, tutte le lesioni erano già state classificate secondo i criteri della "Classificazione WHO-modificata" ed erano già disponibili i dati relativi al diametro dei tumori, al grado di malignità e all'eventuale presenza di invasione del sistema linfatico.

Per ciascun campione i dati di *follow-up* sono stati riferiti, nella maggior parte dei casi (147), all'unico nodulo tumorale presente; nei restanti casi (82), che mostravano invece compresenza di lesioni tumorali di tipo diverso, si è identificato su base morfologica il tumore di aspetto più aggressivo. In particolare, i tumori maligni sono stati considerati più aggressivi

dei benigni e tra i maligni si è discriminato sulla base del grado istologico di malignità. Non si sono inclusi nello studio casi che presentavano esclusivamente tumori benigni di tipo diverso o più tumori maligni di pari grado di malignità.

Sui tumori così selezionati si sono valutati i **margini di escissione** (interessati o non interessati) e l'**attività mitotica**. Quest'ultima è stata misurata conteggiando il numero di mitosi su 10 campi microscopici al 40X. In caso di tumori con doppia popolazione cellulare l'attività mitotica è stata conteggiata separatamente per le due diverse popolazioni neoplastiche.

3.3.2.2 Elaborazioni statistiche

Per studiare le differenze di attività mitotica in funzione del sottotipo tumorale (e della popolazione tumorale in caso di tumori con doppia componente) si è condotta un'analisi della varianza. Sono state calcolate le medie dei minimi quadrati. La significatività utilizzata è stata pari a 5%.

Poiché in tutti i casi di tumore benigno, di carcinoma in tumore misto benigno e di carcinoma semplice tubulare non si erano sviluppate recidive e metastasi e non si erano verificati decessi durante il periodo di osservazione questi casi sono stati esclusi dalle analisi statistiche che valutavano, mediante studi di *survival analysis* e regressione logistica, l'effetto di una serie di variabili in relazione al rischio di decesso o di sviluppo di recidive e metastasi. Per le analisi, inoltre, i carcinomi duttali sono stati raggruppati con i carcinomi papillari intraduttali per affinità morfologica e per garantire un'adeguata numerosità della classe. Relativamente alla razza, soggetti di razza pura sono stati confrontati con cani meticci (in analisi preliminari non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra soggetti appartenenti a diversi gruppi di razza). Per lo studio del valore prognostico dell'attività mitotica è stato scelto, per ciascuno dei casi di neoplasia con doppia popolazione

cellulare e quindi con doppia conta mitotica, di considerare il valore maggiore di attività mitotica calcolato.

Mediante impiego di due modelli di regressione logistica è stato studiato il ruolo di una serie di variabili esplicative in grado di agire come fattori di rischio o di protezione per il decesso degli animali nel primo anno post-chirurgia. In questi modelli sono stati stimati i rischi relativi di decesso nel primo anno post-chirurgia per ciascuno dei livelli della variabili considerate esprimendoli in rapporto a categorie di riferimento. Il primo modello includeva variabili esplicative multicotomiche quali l'età (categoria di riferimento: cani di età pari o inferiore a 5 anni), il sottotipo tumorale (categoria di riferimento: carcinoma complesso), il grado di malignità (categoria di riferimento: grado I) e variabili esplicative dicotomiche quali la sterilizzazione (categoria di riferimento: animale intero), la razza (categoria di riferimento: razza pura), i margini di escissione (categoria di riferimento: margini non interessati) e la concomitante presenza di epiteliosi (categoria di riferimento: assenza di epiteliosi). In aggiunta nel modello si sono incluse anche due variabili esplicative continue ossia il diametro tumorale (valore di riferimento: 0 cm) e l'attività mitotica (valore di riferimento: 0 mitosi su 10 campi al 40X). Il secondo modello era uguale al precedente, con l'unica differenza che considerava, in aggiunta, un'altra variabile esplicativa categorica ossia la concomitante presenza nel campione di invasione del sistema linfatico (categoria di riferimento: assenza di invasione del sistema linfatico). Sono stati calcolati i rapporti di quote (*odds ratios*, OR) con un intervallo di confidenza (IC) al 90%. Rapporti di quote non significativamente diversi da 1 indicavano pari probabilità dell'evento in rapporto alla categoria di riferimento. Valori significativamente diversi da 1 indicavano minor probabilità dell'evento in rapporto alla categoria di riferimento se minori di 1, maggior probabilità dell'evento in rapporto alla categoria di riferimento se maggiori di 1.

Altri 4 modelli di regressione logistica identici ai due precedenti sono stati utilizzati per indagare, rispettivamente, il rischio di sviluppo di recidive e di metastasi a distanza nel primo anno post-chirurgia.

Per lo studio della sopravvivenza in funzione del sottotipo tumorale sono state inizialmente stimate le curve di sopravvivenza mediante il metodo di Kaplan-Meier (metodo non parametrico). Successivamente sono stati utilizzati due modelli di regressione di Cox a rischi proporzionali per lo studio del tempo di vita post-chirurgia e sono stati determinati, analogamente a quanto fatto nei modelli di regressione logistica, i rapporti di rischio (*hazard ratios*, HR). All'interno di questi modelli le variabili prese in considerazione come possibili fattori di rischio o di protezione per l'evento "morte per tumore mammario" erano, oltre al sottotipo tumorale, le medesime testate nei modelli di regressione logistica. I soggetti morti per cause non correlabili al tumore e quelli ancora vivi nel momento in cui è terminata l'osservazione (ossia la raccolta del *follow-up*) sono stati considerati *records censored* (informazioni parziali).

Sono stati stimati i rapporti di rischio (*hazard ratios*, RR) e i relativi intervalli di confidenza (IC) al 90%. La significatività statistica è stata fissata al 10%, preferendo così un valore più elevato rispetto a quello comunemente utilizzato, visti gli scopi prevalentemente esplorativi dello studio.

3.3.3 Studio prognostico B

3.3.3.1 Istopatologia ed immunoistochimica

Tale studio è stato condotto su **245** campioni del **gruppo B** appositamente selezionati per studiare le caratteristiche morfologiche dei carcinomi mammari potenzialmente predittive della diffusione metastatica attraverso il sistema linfatico.

I 245 carcinomi oggetto di studio sono stati classificati secondo i criteri della “**Classificazione WHO-modificata**” ed è stata valutata in ciascun campione la presenza/assenza di **invasione vascolare linfatica** e, per i casi con linfonodo disponibile, la presenza/assenza di **metastasi linfonodali**.

A scopo classificativo, su **18 carcinomi** a morfologia atipica sono state eseguite **analisi immunoistochimiche** per alcuni marcatori di differenziazione cellulare (**CK8/18, CK14, CALP, VIM e p63**) seguendo i medesimi protocolli e criteri di valutazione impiegati nello studio classificativo-epidemiologico.

In ciascun carcinoma si è inoltre valutata, indipendentemente dal sottotipo tumorale, la presenza, anche in singole aree, di tre aspetti morfologici riportati di seguito:

- **Infiltrazione periferica.** Si è ricercata alla periferia del carcinoma l’eventuale presenza di cellule infiltranti lo stroma mammario circostante.
- “**Vasculogenic mimicry**”. Si è valutata l’eventuale presenza nel tumore di singole cellule neoplastiche con un ampio spazio citoplasmatico centrale o di piccoli gruppi di cellule neoplastiche disposte radialmente attorno ad un canale centrale. In entrambi i casi, condizione necessaria per ritenere l’aspetto osservato indicativo di “*vasculogenic mimicry*”, era il reperimento all’interno di questi spazi/canali di cellule ematiche o di altre cellule neoplastiche.
- **Pattern micropapillare.** Si è valutata l’eventuale formazione da parte delle cellule neoplastiche di piccole papille prive di asse fibrovascolare, eventualmente circondate da lacune stromali vuote.

Infine, per ciascun carcinoma è stato calcolato il grado istologico di malignità utilizzando **due diversi sistemi di grading** che sono stati confrontati tra loro. Nello specifico sono stati impiegati il sistema di Clemente e collaboratori (Tabella 5), già utilizzato nell’ambito dello

studio classificativo-epidemiologico, e quello di Misdorp, riportato di seguito (Tabella 8) (Misdorp, 2002).

Tabella 8. Sistema per il calcolo del *grading* istologico di malignità secondo Misdorp (Misdorp, 2002).

Formazione tubuli	Pleomorfismo nucleare	Mitosi e nuclei ipercromatici per campo al 40X	Punteggio
Marcata	Lieve	Occasionali	1
Moderata	Moderato	2-3	2
Scarsa	Marcato	>2-3	3
Valutare ogni caratteristica e sommare i punteggi per determinare il grado istologico di malignità.			
	Somma punteggi	Grado	
	3-5	I	
	6-7	II	
	8-9	III	

3.3.3.2 Elaborazioni statistiche

Per determinare se la classificazione in sottotipi tumorali, l'infiltrazione periferica, il pattern micropapillare, il "*vasculogenic mimicry*" e i due diversi sistemi di *grading* impiegati fossero buoni modelli per predire la tendenza dei carcinomi mammari ad invadere il sistema linfatico si è utilizzata una serie di modelli lineari generalizzati (GLM) con distribuzione binomiale, aventi come funzione *link* la funzione *logit*. Le variabili risposta erano la presenza/assenza di invasione dei vasi linfatici o di metastasi linfonodali.

I primi 2 modelli elaborati hanno testato la capacità della classificazione in sottotipi tumorali di spiegare la presenza/assenza rispettivamente di invasione dei vasi linfatici e di metastasi linfonodali. Per queste analisi alcuni sottotipi tumorali sono stati raggruppati sulla

base di analogie morfologiche. In particolare i carcinomi complessi sono stati considerati insieme ai carcinomi in tumore misto benigno ed i carcinomi semplici tubulari sono stati associati ai carcinomi semplici tubulo-papillari. Altre tipologie tumorali invece (carcinoma micropapillare invasivo, carcinoma adenosquamoso, carcinoma papillare intraduttale, carcinoma con cellule ricche in lipidi e carcinosarcoma), vista la scarsa numerosità di casi, sono state escluse dalle analisi statistiche.

Si sono utilizzati altri 8 modelli per valutare se l'infiltrazione periferica, il pattern micropapillare, il "*vasculogenic mimicry*" e i due diversi sistemi di *grading* impiegati fossero in grado di spiegare la presenza/assenza di invasione dei vasi linfatici e di metastasi linfonodali.

Per comparare la capacità predittiva dei due diversi sistemi di *grading* è stato inoltre effettuato per ciascuno di essi il test di verifica delle informazioni di Akaike (AIC) che misura la qualità della stima di un modello statistico. Brevemente, minore è il valore di AIC calcolato, minore è la perdita di informazioni e pertanto maggiore è la probabilità di interpretare correttamente i dati.

Infine, per identificare il miglior modello in grado di predire la presenza/assenza di invasione vascolare linfatica e di metastasi linfonodali si sono utilizzati due modelli lineari generalizzati in cui i parametri risultati più significativi nelle precedenti analisi sono stati testati simultaneamente mediante impiego della *backward selection procedure*. Per le analisi statistiche descritte, la significatività utilizzata è stata pari a 5%.

4. RISULTATI

4.1 Risultati di Fase 1

L'attenta valutazione morfologica delle lesioni neoplastiche e non-neoplastiche mammarie incluse in questo progetto ha portato ad una rielaborazione ed integrazione della classificazione WHO (Misdorp *et al.*, 1999). In particolare sono stati distinti e descritti in maniera più dettagliata alcuni quadri morfologici di classi specifiche e, in aggiunta, sono state incluse nuove classi morfologiche. Alcune di queste sono le controparti maligne (carcinoma duttale e carcinoma papillare intraduttale) di lesioni benigne già presenti nella classificazione WHO (adenoma duttale o basaloide e adenoma papillare intraduttale o papilloma duttale). Altre sono invece state inserite in classificazione come entità morfologiche specifiche (carcinoma comedonico e carcinoma cribriforme), mentre nella classificazione WHO erano considerate varianti di carcinoma *in situ*. È stato infine incorporato nella classificazione il carcinoma micropapillare invasivo, recentemente riportato in letteratura nel cane (Cassali *et al.*, 2002; Gama *et al.*, 2008b).

Il lavoro di confronto e collaborazione internazionale tra le Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova, Madrid (Spagna) e della Pennsylvania (Philadelphia, USA), per lo studio dei criteri morfologici di classificazione delle neoplasie mammarie del cane, ha portato inoltre alla stesura del seguente lavoro scientifico:

Goldschmidt M.H, Peña L., Rasotto R., Zappulli V: Classification and grading of canine mammary tumors. Veterinary Pathology (accettato per la pubblicazione).

In tale lavoro (vedi Allegato A) la “Classificazione WHO-modificata” viene presentata e proposta come “Nuova classificazione istologica 2010 per le neoplasie e iperplasie/displasie della mammella del cane”.

4.2 Risultati di Fase 2

4.2.1 Studio classificativo-epidemiologico

La popolazione di cani esaminata comprendeva 1898 soggetti femmina di età media pari a 9.2 anni (*range*: 1-19 anni). Il 73.1% della popolazione era composto da animali interi e il 26.9% da animali sterilizzati. Per 1761 animali era noto se questi fossero di razza pura (63.7%) o meticci (36.3%). Le frequenze dei soggetti meticci e dei vari gruppi di razza, definiti secondo gli *standards* della Federazione Cinofila Internazionale, sono riportate in Tabella 9. I gruppi di razza più rappresentati erano il gruppo 3 (12.8%) e il gruppo 1 (11.3%).

Tabella 9. Frequenze nella popolazione esaminata dei soggetti meticci e dei gruppi di razza definiti secondo gli *standards* della Federazione Cinofila Internazionale.

Gruppi di razza	Numero e percentuale di animali
Gruppo 1: Cani da pastore e bovani, esclusi i bovani svizzeri	199 (11.3%)
Gruppo 2: Cani di tipo pinscher, schnauzer, molossoidi e cani bovani svizzeri	183 (10.4%)
Gruppo 3: Terrier	225 (12.8%)
Gruppo 4: Bassotti	98 (5.6%)
Gruppo 5: Cani tipo spitz e tipo primitivo	39 (2.2%)
Gruppo 6: Segugi e cani per pista di sangue	50 (2.9%)
Gruppo 7: Cani da ferma	102 (5.8%)
Gruppo 8: Cani da riporto, da cerca e da acqua	96 (5.4%)
Gruppo 9: Cani da compagnia	123 (6.9%)
Gruppo 10: Levrieri	7 (0.4%)
Meticci	639 (36.3%)
Totale	1761 (100%)

Dall'analisi morfologica dei 1898 campioni sono emerse in tutto **5186 lesioni**. Si veda l'appendice fotografico per l'esemplificazione delle tipologie di lesione più frequenti.

Le lesioni diagnosticate con maggior frequenza erano i tumori maligni (36.4%) e le iperplasie/displasie (34.4%), seguite dai tumori benigni (22.6%). Hanno presentato

un'incidenza decisamente inferiore l'epiteliosi (3.3%) e i segni di invasione del sistema linfatico (3.3%) (Figura 4).

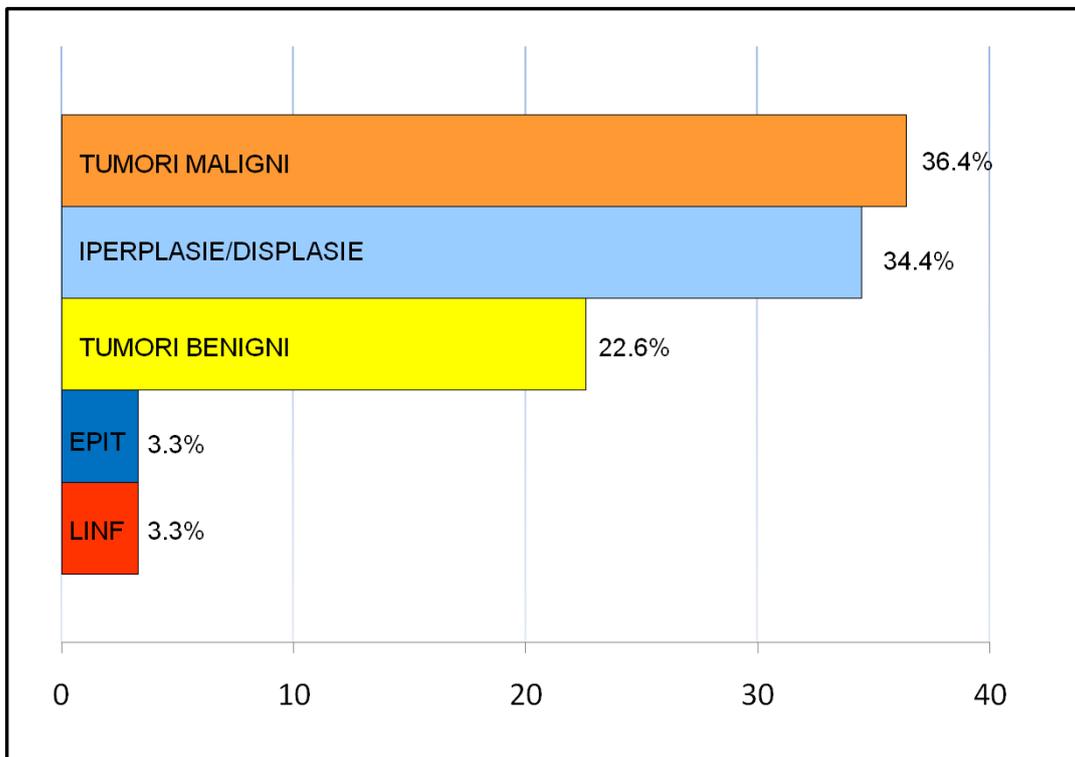


Figura 4. Frequenze delle diverse tipologie di lesione sul totale delle lesioni diagnosticate. “EPIT”=epiteliosi; “LINF”=invasione del sistema linfatico.

Le **iperplasie/displasie** (1782) includevano le iperplasie lobulari, le ectasie duttali e le iperplasie duttali che, sul totale delle lesioni, erano rispettivamente il 26%, il 6.7% e l'1.7%. Tra le iperplasie lobulari (1349) erano prevalenti quelle di aspetto classico (83.4%) e decisamente più rare quelle con fibrosi (7.6%), con aspetti di atipia (4.9%) e con attività secernente (4.1%).

I **tumori** sono stati distinti in numerosi sottotipi tumorali benigni e maligni, le cui frequenze sul totale delle lesioni tumorali (3061) sono riportate in Figura 5.

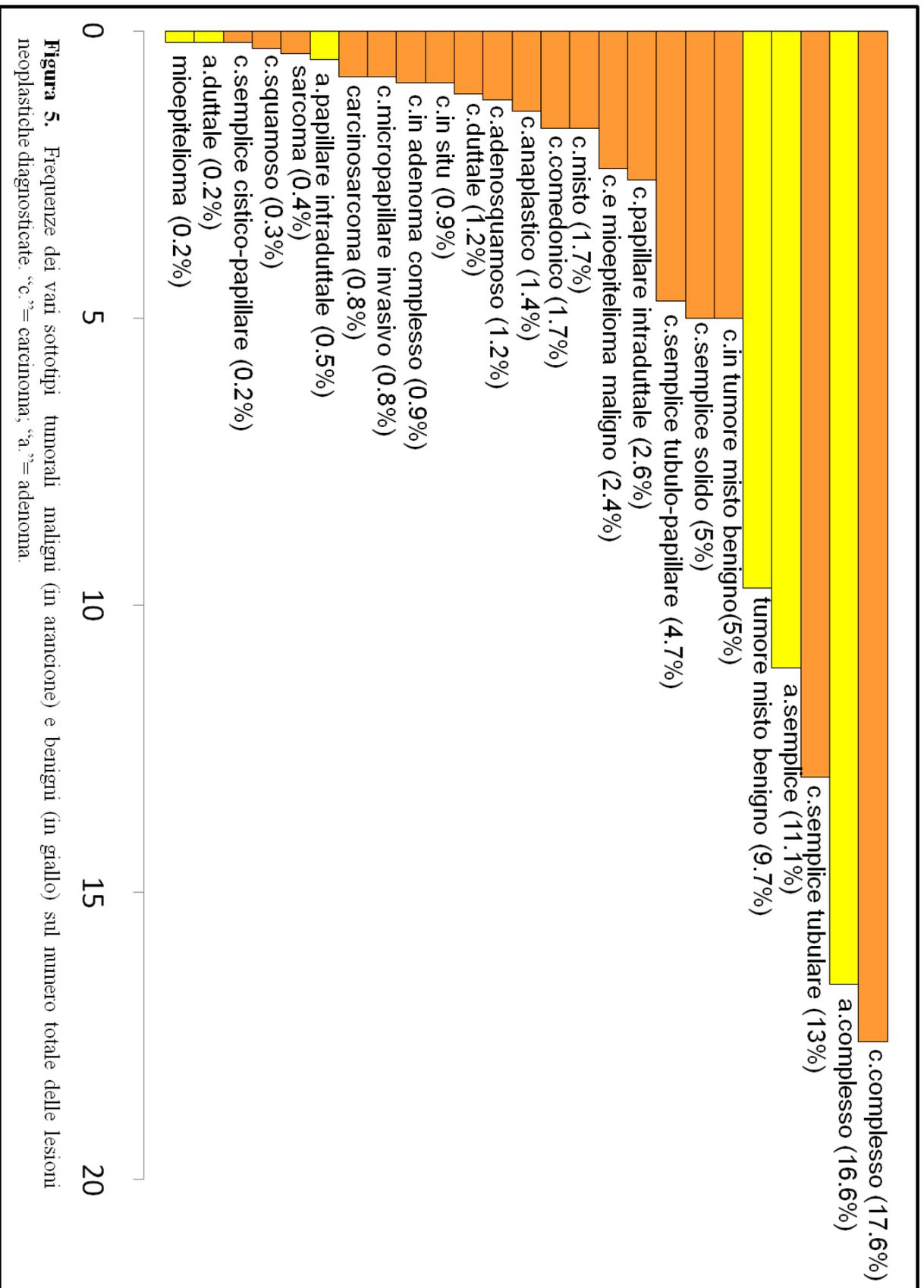


Figura 5. Frequenze dei vari sottotipi tumorali maligni (in arancione) e benigni (in giallo) sul numero totale delle lesioni neoplastiche diagnosticate. "c."= carcinoma; "a."= adenoma.

I due sottotipi tumorali più comuni erano il carcinoma complesso (17.6%) e la sua controparte benigna, ossia l'adenoma complesso (16.6%). Seguivano due forme semplici: il carcinoma semplice tubulare (13%) e l'adenoma semplice (11.1%). Hanno presentato invece una frequenza leggermente inferiore due forme miste, il tumore misto benigno (9.7%) e il carcinoma in tumore misto benigno (5%) e altre due forme semplici maligne, il carcinoma semplice solido (5%) e il carcinoma semplice tubulo-papillare (4.7%). I restanti tumori (17.3%) si sono distribuiti, con una frequenza sul totale sempre < al 3%, in 17 diverse categorie tumorali, 14 maligne e 3 benigne (carcinoma papillare intraduttale, carcinoma e mioepitelioma maligno, carcinoma misto, carcinoma comedonico, carcinoma anaplastico, carcinoma adenosquamoso, carcinoma duttale, carcinoma *in situ*, carcinoma in adenoma complesso, carcinoma micropapillare invasivo, carcinosarcoma, sarcoma, carcinoma squamoso, carcinoma semplice cistico-papillare, adenoma papillare intraduttale, adenoma duttale e mioepitelioma). All'interno di queste 17 categorie si sono inclusi il 26.7% e il 2.5% rispettivamente di tutti i tumori maligni e benigni.

Il 75.8% di tutte le lesioni osservate nei campioni sono state diagnosticate in animali interi e il restante 24.2% in animali sterilizzati. Confrontando questi due gruppi, si sono osservate alcune differenze nella frequenza delle varie tipologie di lesione (Figura 6).

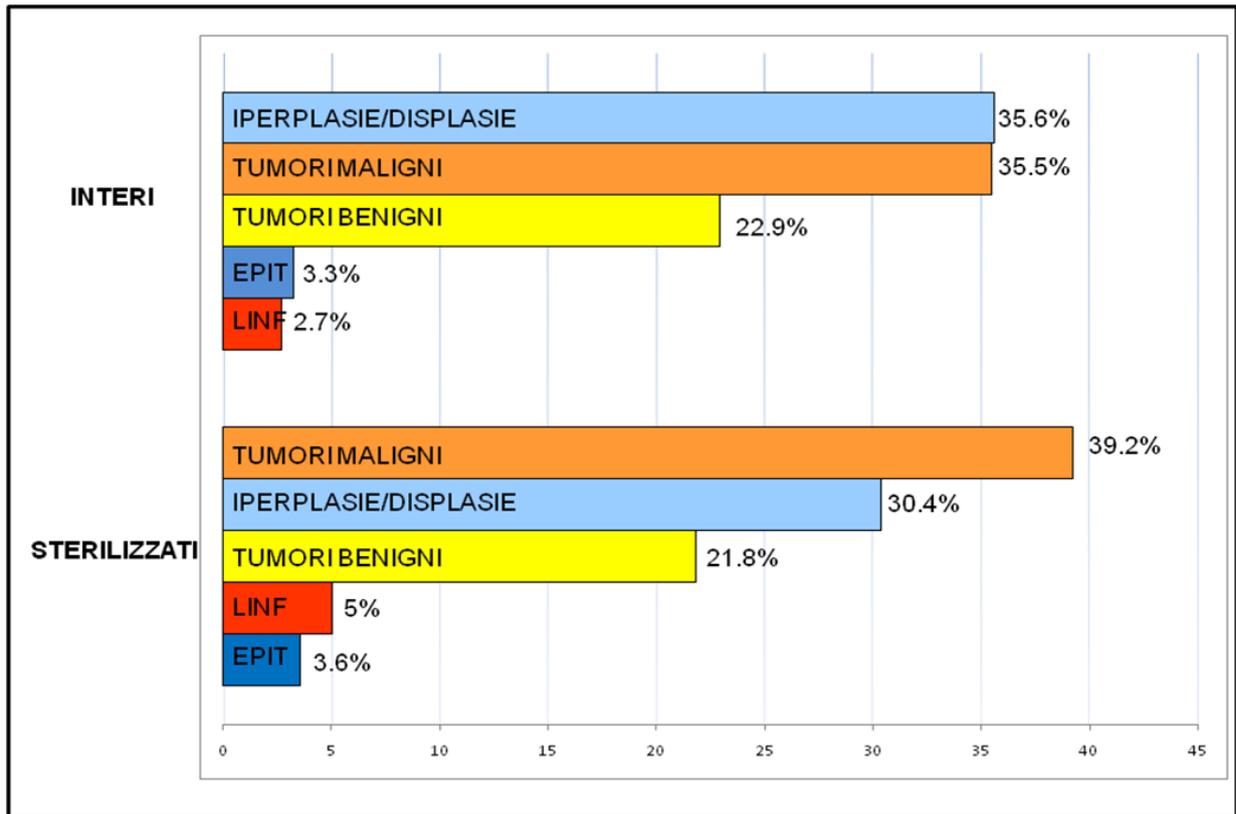


Figura 6. Frequenze delle diverse tipologie di lesione negli animali interi e in quelli sterilizzati. “EPIT”=epiteliosi; “LINF”=invasione del sistema linfatico.

Nello specifico, le iperplasie/displasie sono apparse significativamente ($P < 0.0001$) più frequenti negli animali interi (35.6%) che negli sterilizzati (30.4%), tanto che nei primi queste sono state le lesioni in assoluto più spesso diagnosticate (Figura 6). Prendendo in considerazione i vari tipi di lesioni iperplastiche/displastiche si è visto che erano in particolare le iperplasie lobulari ad essere significativamente più frequenti ($P < 0.0001$) nei soggetti interi (27.2%) rispetto agli sterilizzati (22.2%), mentre si sono riscontrate percentuali di frequenza simili tra i due gruppi per quanto riguarda l’iperplasia duttale (1.8% vs 1.3%) e l’ectasia duttale (6.6% vs 6.8%).

L’incidenza di tumori maligni era invece significativamente ($P < 0.0001$) più elevata negli animali sterilizzati (39.2%) rispetto agli interi (35.5%) (Figura 6). Si sono anche messe in evidenza tra i due gruppi di animali differenze statisticamente significative ($P < 0.0001$)

nell'incidenza dei sottotipi tumorali maligni. Tali differenze erano, nella maggior parte dei casi, di lieve entità. Nello specifico erano più frequenti negli interi rispetto agli sterilizzati i carcinomi complessi (10.8% vs 8.9%), i carcinomi in tumore misto benigno (3% vs 2.5%) ed i carcinomi misti (1.1% vs 0.8%). Tutti gli altri tumori maligni erano leggermente più comuni tra gli animali sterilizzati, con l'unica eccezione del carcinoma semplice solido che aveva un'incidenza quasi doppia negli sterilizzati (4.5% vs 2.4%).

Si è osservata inoltre tra i due gruppi un'incidenza significativamente ($P < 0.0001$) diversa di invasione del sistema linfatico con una percentuale quasi doppia negli animali sterilizzati (5% vs 2.7%) (Figura 6). Per quanto riguarda l'incidenza dei tumori benigni, questa non era significativamente diversa tra i due gruppi e l'essere sterilizzato o meno non influenzava in alcun senso la probabilità di riscontrare tumori benigni. Anche la frequenza con cui si è manifestata l'epiteliosi era simile tra i 2 gruppi (Figura 6).

Confrontando il gruppo dei cani meticci con quello dei cani di razza pura non si sono osservate differenze significative relativamente all'incidenza delle varie tipologie di lesione. Tuttavia, nell'ambito dell'analisi di regressione logistica, distinguendo i soggetti di razza pura nei vari gruppi di razza, si è dimostrato un rischio significativamente inferiore di presentare tumori maligni per i cani meticci ($P < 0.005$, $OR = 0.46$, $IC = 0.28-0.74$) e per quelli appartenenti al gruppo 4 ($P < 0.05$, $OR = 0.49$, $IC = 0.25-0.95$) e al gruppo 3 ($P < 0.005$, $OR = 0.40$, $IC = 0.23-0.70$). L'appartenenza al gruppo dei meticci o ad uno specifico gruppo di razza non influenzava invece in alcun modo la probabilità di riscontrare tumori benigni.

Tra fasce d'età diverse si sono notate differenze statisticamente significative ($P < 0.0001$) nella frequenza delle varie tipologie di lesione (Figura 7). Dai 6 anni di età (età6) in poi si osservava, al crescere dell'età, una progressiva diminuzione della frequenza delle lesioni iperplastiche/displastiche. I tumori maligni, invece, dai 6 anni in poi aumentavano via via di frequenza e infatti, mediante l'analisi di regressione logistica si è evidenziato un rischio

significativamente maggiore di tumore maligno nelle quattro fasce d'età più elevate (età10: $P < 0.0005$, $OR = 2.50$, $IC = 1.55-4.03$; età11: $P < 0.005$, $OR = 2.44$, $IC = 1.37-4.34$; età12: $P < 0.005$, $OR = 2.23$, $IC = 1.29-3.83$; età13: $P < 0.05$, $OR = 1.83$, $IC = 1.07-3.15$). Sebbene si sia osservato un certo trend di diminuzione della percentuale dei tumori benigni al crescere dell'età, il rischio di riscontrare queste lesioni non era significativamente diverso tra soggetti appartenenti a fasce d'età diverse. Come per i tumori maligni, anche per l'epiteliosi e l'invasione del sistema linfatico si è notato un incremento di frequenza al crescere dell'età rispettivamente a partire dagli 8 anni (età8) e dai 7 anni (età7). Nonostante il progressivo incremento, sopra descritto, di tumori maligni e di invasione del sistema linfatico rispettivamente a partire dai 6 anni e 7 anni, è stato interessante notare come invece i soggetti in assoluto più giovani della popolazione, ossia di età pari o inferiore a 5 anni (età5), avessero, rispetto a quelli delle due fasce d'età successive (età6 ed età7), percentuali più elevate di tumori maligni e di invasione del sistema linfatico e invece inferiori di iperplasie/displasie e tumori benigni.

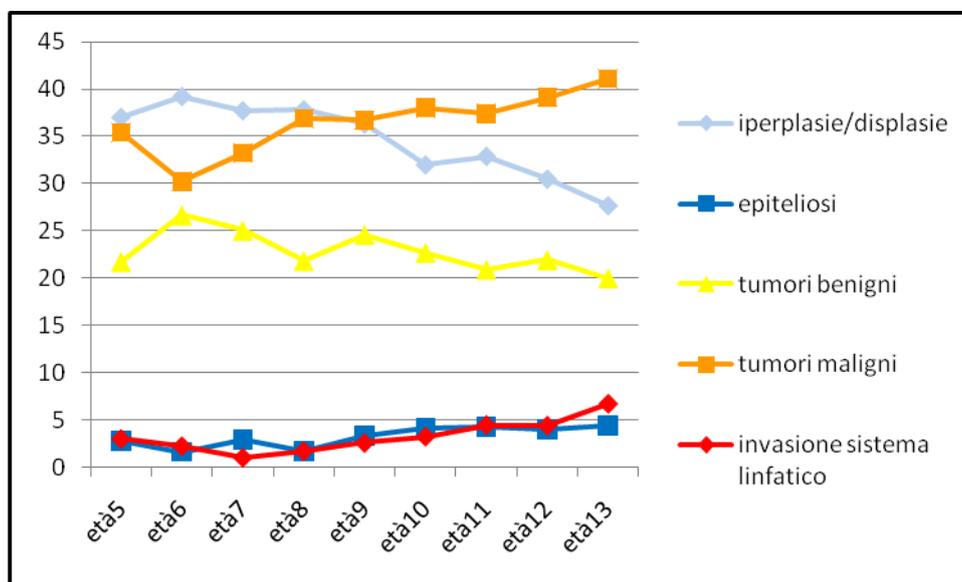


Figura 7. Frequenze delle varie tipologie di lesione in funzione delle fasce d'età.

Dei 1824 animali con lesioni tumorali, il 60.7% presentava un solo tipo di tumore. L'unica tipologia tumorale presente era maligna nel 67.3% dei casi e benigna nel 48.7% dei casi. Il

restante 39.3% degli animali con lesioni tumorali aveva invece un'associazione di diverse tipologie tumorali nel campione. Nella maggior parte dei casi (58.5%) vi era un'associazione di tumori benigni con maligni, mentre meno spesso si osservavano associati esclusivamente tipi diversi di tumori maligni (28.4%) e tipi diversi di tumori benigni (13.1%). Se era presente un tumore benigno era minore la probabilità di riscontrare nel campione un tumore maligno ($P < 0.0001$, $OR = 0.07$, $IC = 0.05-0.09$) e, viceversa, la presenza di un tumore maligno si associava ad una minor probabilità di diagnosticare un tumore benigno nel medesimo soggetto ($P < 0.0001$, $OR = 0.06$, $IC = 0.04-0.08$).

In presenza di lesioni iperplastiche/displastiche aumentava il rischio di riscontrare tumori benigni ($P < 0.0001$, $OR = 2.29$, $IC = 1.78-2.94$), ma non tumori maligni ($P = 0.89$, $OR = 1.01$, $IC = 0.76-1.36$). L'epiteliosi costituiva un fattore di rischio per i tumori benigni ($P < 0.005$, $OR = 1.74$, $IC = 1.19-2.52$) e anche, soprattutto, per quelli maligni ($P < 0.001$, $OR = 2.27$, $IC = 1.42-3.63$). Si è evidenziata infine una forte associazione positiva tra i tumori maligni e l'invasione del sistema linfatico ($P < 0.0001$, $OR = 5.67$, $IC = 2.34-13.70$).

Relativamente alla **distribuzione istologica** dei tumori diagnosticati è emerso che questi erano significativamente più frequenti in forma focale (nodulo singolo di una specifica tipologia istologica) che multifocale (noduli diversi di una medesima specifica tipologia istologica) (76.8% vs 23.2%) ($P < 0.05$). Comparando tumori maligni e benigni si è visto che nei secondi la distribuzione multifocale era, seppur di poco, significativamente più frequente (21.7% vs 25.6%) ($P < 0.05$). Sebbene per ogni sottotipo tumorale si sia confermata la prevalenza delle lesioni focali sulle multifocali, si sono notate alcune differenze tra i sottotipi. Ad esempio, erano quasi sempre focali i sarcomi/carcinosarcomi (94.4%), i carcinomi misti (92.3%) ed i carcinomi anaplastici (91.1%). La distribuzione focale è risultata invece solo lievemente più frequente di quella multifocale nei carcinomi papillari intraduttali/duttali (57% vs 43%) e nei carcinomi micropapillari invasivi (54.5% vs 45.5%). Non si sono osservate

differenze significative di distribuzione istologica dei tumori in funzione dell'età, della razza e dell'eventuale sterilizzazione degli animali.

Il **grado istologico di malignità** è stato calcolato per tutti i carcinomi ad eccezione dei carcinomi *in situ* e dei carcinomi squamosi, quindi, in totale per 1835 carcinomi. Nella maggior parte dei casi questi sono stati classificati come grado I e meno frequentemente come grado II e grado III (Figura 8).

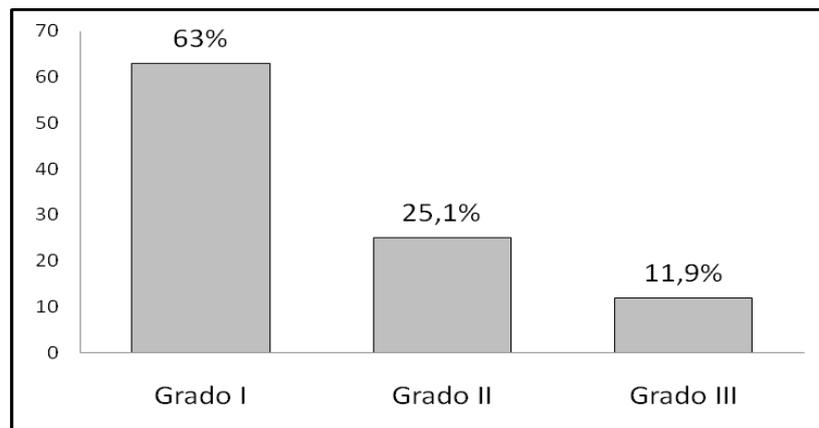


Figura 8. Classificazione dei carcinomi nei tre gradi di malignità.

Rispetto al grado di malignità, si sono notate alcune differenze, per quanto non statisticamente significative, a seconda del sottotipo tumorale. Tutti i carcinomi anaplastici erano di grado III. In aggiunta, i tumori di grado III prevalevano nel gruppo dei carcinomi comedonici e in quello dei carcinomi micropapillari invasivi (rispettivamente 61% e 45,4%). Il grado più spesso attribuito ai carcinomi adenosquamosi, alla componente carcinomatosa dei carcinosarcomi e ai carcinomi solidi era il grado II (rispettivamente 66,6%, 63,6% e 49,6%). Nell'ambito di tutti gli altri sottotipi tumorali prevalevano invece i tumori di grado I.

Mettendo a confronto animali interi e sterilizzati sono emerse delle differenze statisticamente significative ($P < 0.001$) per quanto riguarda la distribuzione dei carcinomi nei tre gradi di malignità. Negli animali sterilizzati, rispetto agli interi, sono stati diagnosticati in

proporzione un maggior numero di tumori di grado III e di grado II e un minor numero di tumori di grado I (Figura 9).

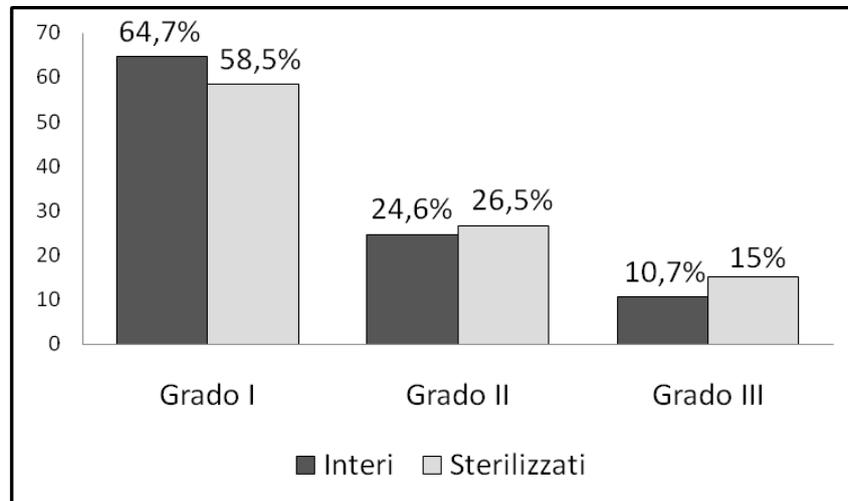


Figura 9. Confronto tra animali interi e sterilizzati relativamente alla classificazione dei carcinomi nei tre gradi di malignità.

Anche tra fasce d'età diverse si sono notate differenze statisticamente significative ($P < 0.005$) nella distribuzione dei carcinomi nei tre gradi di malignità. All'aumentare dell'età si evidenzia una tendente diminuzione della percentuale di tumori di grado I e un tendente incremento della percentuale di tumori di grado III. I tumori di grado II invece non hanno mostrato sostanziali differenze di frequenza al variare dell'età (Figura 10).

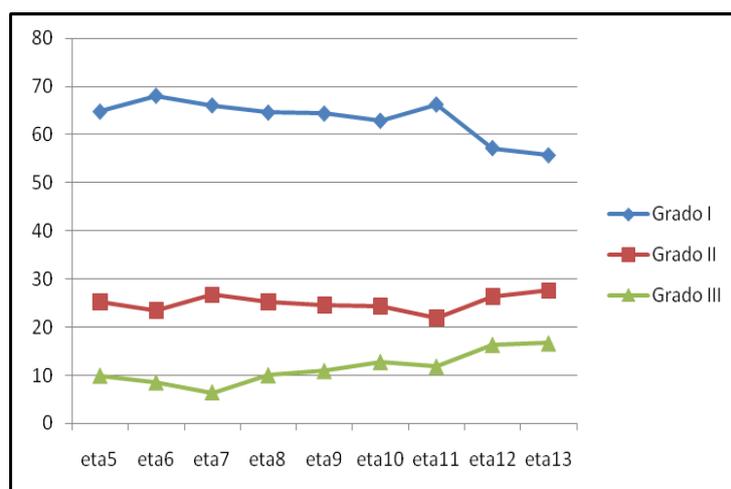


Figura 10. Frequenze dei carcinomi di grado I, di grado II e di grado III a seconda della fascia d'età.

Non si sono osservate variazioni significative di frequenza dei tre gradi di malignità in funzione della razza o relazioni tra il grado e la distribuzione istologica dei tumori.

Il **diametro** tumorale è stato misurato per l'87.2% delle lesioni tumorali diagnosticate. Nel restante 12.8% dei casi, invece, non è stato possibile eseguire la misurazione perché i noduli non erano stati inviati dai veterinari per intero.

Il diametro dei tumori variava da 0.2 cm a 8 cm. Dalla prima analisi della varianza elaborata è emerso che il diametro tumorale era significativamente influenzato dall'età degli animali, dalla razza e dal sottotipo tumorale, mentre non dipendeva dalla distribuzione istologica delle lesioni e dall'eventuale sterilizzazione dei soggetti (Tabella 10). All'aumentare dell'età il diametro tumorale medio tendeva ad aumentare. I gruppi di razza che presentavano diametri tumorali medi maggiori erano il gruppo 5, il gruppo 8 e il gruppo 6, mentre quelli con i diametri medi inferiori erano il gruppo 10, il gruppo 3 e il gruppo 4. I tumori con diametro medio maggiore erano i carcinomi anaplastici, i sarcomi/carcinosarcomi ed i carcinomi misti mentre quelli mediamente più piccoli erano il carcinoma *in situ* e l'adenoma semplice.

Tabella 10. Analisi della varianza del diametro (R-quadro=0.21; Media quadratica dell'errore=0.95). *Medie MQ= medie dei minimi quadrati; "c."= carcinoma; "a."= adenoma.

Variabile	Valore F	P	Categorie	Medie MQ* (cm)
Età	3.59	< 0.0001	età5	1.7
			età6	1.7
			età7	1.7
			età8	1.7
			età9	1.7
			età10	1.9
			età11	1.9
			età12	1.8
			età13	2.2
Razza	2.46	< 0.05	gruppo 1	1.9
			gruppo 2	1.9
			gruppo 3	1.5
			gruppo 4	1.6
			gruppo 5	2.2
			gruppo 6	2

Variabile	Valore F	P	Categorie	Medie MQ* (cm)
Razza	2.46	< 0.05	gruppo 7 gruppo 8 gruppo 9 gruppo 10 Meticci	1.8 2.1 1.7 1.3 1.8
Sterilizzazione	1.93	0.16	Intero Sterilizzato	1.9 1.8
Sottotipo tumorale	9.98	< 0.0001	c.anaplastico c.squamoso/c.adenosquamoso c.complesso c.in tumore misto benigno c.in adenoma complesso c.comedonico sarcoma/carcinosarcoma c.papillare intraduttale/c.duttale c.semplice solido c.semplice tubulare c.semplice tubulo-papillare/c.cisto-papillare c.misto c.micropapillare invasivo c.e mioepitelioma maligno c.in situ a.semplice a.complesso/mioepitelioma tumore misto benigno a.papillare intraduttale/a.duttale	3.8 1.4 1.2 1.4 1.2 1.8 3 1.2 1.8 0.9 1.2 2.4 1.3 2.2 0.2 0.5 0.8 1.1 0.6
Distribuzione	2.57	0.10	Focale Multifocale	1.8 1.9

Nel secondo modello elaborato, la distinzione dei tumori in benigni e maligni è apparsa come fattore capace di influenzare significativamente il diametro, con valori di media dei minimi quadrati maggiori per le forme maligne (1.2 cm) rispetto alle benigne (0.7 cm) ($P < 0.0001$). Tuttavia la variabilità spiegata da questo secondo modello è risultata essere inferiore (R -quadro=0.09).

Dei 1887 tumori maligni analizzati in questo studio, 122 (6.4%) presentavano, in associazione ad una classica componente epiteliale luminale maligna organizzata in tubuli e/o nidi (carcinoma), una seconda popolazione cellulare, pleomorfa, disposta perifericamente alla prima con grave espansione del compartimento interstiziale. Questa seconda popolazione cellulare presentava aspetti morfologici molto eterogenei, con diversi pattern di organizzazione (in brevi fasci o in aree solide o a tappeto) e con caratteristiche citomorfologiche variabili (forma da fusata ad irregolarmente poligonale o rotondeggiante, citoplasma da scarso eosinofilo a moderato-abbondante e vacuolizzato, nucleo rotondo-ovalare ipercromatico o con cromatina marginata e con un nucleolo evidente). Talvolta, in associazione, si osservava anche scarsa-moderata matrice debolmente basofila. Queste cellule presentavano caratteristiche di malignità con anisocitosi ed anisocariosi da moderate a gravi e con un numero variabile di figure mitotiche (*range*: 5-30).

Questi aspetti morfologici non erano chiaramente riconducibili ad una delle tipologie tumorali note. Tuttavia, dovendo formulare una diagnosi per il veterinario clinico si è deciso, sulla base degli aspetti morfologici prevalenti, di inserire questi tumori in una delle tre seguenti classi morfologiche: carcinoma e mioepitelioma maligno (60.6%) (se la componente pleomorfa era prevalentemente fusata-stellata, con vacuolizzazioni e associata a matrice), carcinoma semplice solido (35.3%) (se la componente pleomorfa era prevalentemente disposta in aree solide o a tappeto ed era difficilmente distinguibile da quella epiteliale luminale) e carcinosarcoma (4.1%) (se la componente pleomorfa era prevalentemente fusata e disposta in fasci).

Successivamente, per approfondire questi quadri morfologici atipici si è deciso di effettuare uno studio immunohistochimico per CK8/18, CK14, CK5, SMA, CALP, VIM, p63, Ki-67 ed HER-2, su 25 di questi tumori con popolazione cellulare pleomorfa. Di questi 25 tumori, 10 erano stati diagnosticati come carcinoma e mioepitelioma maligno, 9 come

carcinoma semplice solido e 6 come carcinosarcoma. A fini comparativi, i medesimi marcatori sono stati indagati anche su 20 carcinomi complessi e su 20 carcinomi semplici tubulari o tubulo-papillari. Per una corretta interpretazione dei risultati di espressione tumorale i marcatori di differenziazione cellulare sono stati analizzati anche su 10 campioni aggiuntivi di tessuto mammario canino sano/lievemente iperplastico. In appendice fotografico sono riportate foto riferibili ad alcuni dei risultati più interessanti emersi in questo studio immunohistochimico.

Partendo dall'espressione rilevata nel tessuto sano/iperplastico, le analisi immunohistochimiche eseguite hanno confermato quanto già presente in letteratura, ma hanno anche messo in evidenza alcuni dettagli in più circa la marcatura di specifiche popolazioni cellulari della ghiandola mammaria del cane da parte degli anticorpi utilizzati. In Tabella 11 vengono schematicamente riportati i risultati ottenuti evidenziando gli aspetti notati in questo lavoro, fin'ora mai descritti nel cane.

In particolare, a livello dello strato epiteliale luminale si è confermata la presenza di un pool di cellule + solo per CK8/18. In aggiunta a questo dato già noto, si è evidenziato anche un piccolo pool di cellule luminali, localizzate esclusivamente a livello dei dotti, soprattutto intralobulari, + anche per CK5 e CK14. Nello strato basale/mioepiteliale il profilo di espressione prevalentemente riscontrato è stato quello già descritto in letteratura, ossia la marcatura da parte di CK5, CK14, SMA, CALP, VIM e p63. Occasionalmente si sono però identificati altri due pool cellulari inclusi nello strato basale/mioepiteliale. Il primo, evidenziato a livello di alcuni dotti interlobulari, comprendeva cellule che erano + per CK5, CK14, p63 e VIM, ma non per i marcatori contrattili (CALP e SMA). Il secondo pool, individuato a carico di alcuni lobuli ghiandolari, era invece composto da cellule che differivano dal pool prevalente in quanto negative per CK5, CK14 e talvolta per p63 e + per

CALP, SMA e VIM. I fibroblasti ed i miofibroblasti dello stroma, come da letteratura, sono stati marcati rispettivamente da VIM e da VIM e proteine contrattili.

Tabella 11. Espressione immunoistochimica di CK8/18, CK14, CK5, SMA, CALP, VIM e p63 nei campioni di tessuto mammario sano/lievemente iperplastico esaminati. Indicate in rosso e con * sono evidenziati i risultati non descritti in letteratura.

Marcatore	Strato epiteliale luminale		Strato basale/mioepiteliale			Stroma	
						Fibroblasti	Miofibroblasti
CK8/18	+	+	-*	-	-*	-	-
CK5	-	+	+	+	-*	-	-
CK14	-	+	+	+	-*	-	-
SMA	-	-*	-*	+	+	-	+
CALP	-	-*	-*	+	+	-	+/-
VIM	-	-*	+	+	+	+	+
p63	-	-*	+	+	+/-*	-	-

Nei 25 tumori con popolazione interstiziale pleomorfa, si sono osservati i profili di espressione riportati di seguito:

- In 1 TUMORE
 - Popolazione epiteliale luminale: + CK8/18, CK5, CK14
 - Popolazione interstiziale pleomorfa: + CK8/18, CK5, CK14

Si è desunto che il tumore fosse costituito in realtà da un'unica popolazione cellulare epiteliale luminale che assumeva, a livello interstiziale, un aspetto pleomorfo. È stata quindi confermata per questo tumore la diagnosi formulata inizialmente di carcinoma semplice solido.

- In 4 TUMORI
 - Popolazione epiteliale luminale: + CK8/18, CK5, CK14, (VIM)
 - Popolazione interstiziale pleomorfa: + VIM

È stato attribuito alla popolazione interstiziale pleomorfa un fenotipo mesenchimale, pertanto i tumori sono stati classificati come carcinosarcomi, confermando quanto sospettato all'ematossilina-eosina. In 2 casi si è notata un'inattesa debole-moderata positività delle cellule epiteliali luminali per VIM.

- In 20 TUMORI

- Popolazione epiteliale luminale: + CK8/18, CK5, CK14, (VIM)

- Popolazione interstiziale pleomorfa: + CK5, CK14, SMA, CALP, VIM, p63, (CK8/18)

Vista l'espressione di marcatori basali/mioepiteliali da parte della popolazione interstiziale pleomorfa (in 16 casi espressione di tutti i marcatori basali/mioepiteliali e in 4 casi solo di CK5, CK14, p63 e VIM) è stata formulata una diagnosi finale di carcinoma e mioepitelioma maligno, che in 10 casi confermava quanto già sospettato all'ematossilina-eosina, mentre in 8 casi confutava la diagnosi originale di carcinoma semplice solido e in 2 casi quella di carcinosarcoma. In 5 casi si è notata anche un'inattesa debole positività delle cellule epiteliali luminali per VIM e in altri 6 casi delle cellule interstiziali pleomorfe per CK8/18.

Di seguito vengono invece riportate le positività osservate nei 20 carcinomi semplici (tubulari e tubulo-papillari) e nei 20 carcinomi complessi esaminati:

- CARCINOMI SEMPLICI

- Popolazione epiteliale luminale: + CK8/18, CK5, CK14

- CARCINOMI COMPLESSI

- Popolazione epiteliale luminale: + CK8/18, CK5, CK14, (VIM)

- Popolazione interstiziale mioepiteliale: + CK5, CK14, SMA, CALP, VIM, p63

In 3 casi si è notata un'inattesa debole positività delle cellule epiteliali luminali per VIM.

Tutti i risultati di positività sopra descritti, ove non diversamente specificato, facevano riferimento ad un'intensità di colorazione moderata-forte, citoplasmatica per tutti i marcatori fatta eccezione per l'espressione nucleare di p63.

Andando invece ad analizzare le percentuali medie di espressione di ciascun marcatore in ognuna delle popolazioni tumorali esaminate si sono evidenziate significative differenze (Tabella 12).

Tabella 12. Espressione media di CK8/18, CK14, CK5, SMA, CALP, VIM e p63 nelle varie popolazioni tumorali studiate. Analisi della varianza (CK8/18: R-quadro=0.87, Media quadratica errore=286.11, Valore F=213.16; P<0.0001; CK5: R-quadro=0.34, Media quadratica errore=833.76, Valore F=13.5; P<0.0001; CK14: R-quadro=0.38, Media quadratica errore=795.09, Valore F=8.05; P<0.0001; P<0.0001; SMA: R-quadro=0.51, Media quadratica errore=546.64, Valore F=27.34; P<0.0001; CALP: R-quadro=0.63, Media quadratica errore=456.63, Valore F=44.58; P<0.0001; VIM: R-quadro=0.78, Media quadratica errore=474.66, Valore F=89.81; P<0.0001; p63: R-quadro=0.72, Media quadratica errore=333.50, Valore F=61.31; P<0.0001).

Tumore	Popolazione tumorale	Medie MQ* di espressione dei marcatori immunoistochimici (%)						
		CK8/18	CK5	CK14	SMA	CALP	VIM	p63
Carcinomi semplici	Epit.	81.9	34.3	18.6	0	0	0	0
Carcinomi complessi	Epit.	98.5	61.2	14.3	0	0	2.6	0
	Mioepit.	0	14.6	9.5	31.2	38.2	94.4	23.8
Carcinomi e mioepiteliomi maligni	Epit.	97.7	44.5	31.4	0	0	5.5	0
	Mioepit.	9.2	57.1	60.5	59.1	68.4	66.7	74.6
Carcinosarcomi	Epit.	73.3	83.3	83.3	0	0	36.7	0
	Mesenc.	0	0	0	0	0	100	0

Medie MQ* = medie dei minimi quadrati; “Epit.” = popolazione epiteliale luminale; “Mioepit.” = popolazione mioepiteliale interstiziale; “Mesenc.” = popolazione mioepiteliale/mesenchimale interstiziale.

In particolare si è notato che la popolazione mioepiteliale interstiziale dei carcinomi complessi presentava, rispetto a quella dei carcinomi e mioepiteliomi maligni, una positività nettamente inferiore per CK5, CK14, p63 e, seppur con differenze di minore entità, per SMA e CALP. Il mioepitelio dei carcinomi complessi era invece maggiormente marcato dalla VIM che, a sua volta, era espressa in percentuali più basse dalla popolazione mioepiteliale pleomorfa dei carcinomi e mioepiteliomi maligni.

Si è inoltre osservato che la popolazione epiteliale luminale dei carcinosarcomi, rispetto alle altre epiteliali luminali, aveva un'espressione media più bassa di CK8/18, ma più elevata di CK5, CK14 e VIM.

Sui medesimi tumori è stato studiato anche il *marker* proliferativo Ki-67. La tipica positività nucleare evidenziata era di intensità debole o moderata. Si sono osservate differenze statisticamente significative in termini di percentuale di espressione di questa proteina nelle diverse popolazioni tumorali (Tabella 13).

Tabella 13. Analisi della varianza dell'espressione di Ki-67 (R-quadro=0.50; Media quadratica dell'errore=58.62).

Variabile	Valore F	P	Categorie	Ki-67 (%) Medie MQ*
Popolazione tumorale	17.03	< 0.0001	Carcinoma semplice (Epit.)	14.3
			Carcinoma complesso (Epit.)	13.5
			Carcinoma complesso (Mioepit.)	12.2
			Carcinoma e mioepitelioma maligno (Epit.)	11.3
			Carcinoma e mioepitelioma maligno (Mioepit.)	28.4
			Carcinosarcoma (Epit.) Carcinosarcoma (Mesenc.)	14.3 32.5
Epiteliosi	4.28	< 0.05	Presenza	23
			Assenza	12.3
Invasione del sistema linfatico	3.51	0.06	Presenza	20.5
			Assenza	14.7

Medie MQ*=medie dei minimi quadrati; "Epit."= popolazione epiteliale luminale; "Mioepit." = popolazione mioepiteliale interstiziale; "Mesenc." = popolazione mioepiteliale/mesenchimale interstiziale; "Presenza" = popolazioni tumorali con concomitante presenza della variabile indicata; "Assenza" = popolazioni tumorali non associate alla variabile indicata.

In particolare, la popolazione mioepiteliale pleomorfa dei carcinomi e mioepiteliomi maligni aveva un'espressione media di Ki-67 che era più del doppio di quella del mioepitelio dei carcinomi complessi. Era però a carico della componente mesenchimale dei carcinosarcomi

che si rilevavano i valori medi più elevati. L'espressione di Ki-67 era invece simile nelle varie popolazioni epiteliali luminali (Tabella 13).

Il livello di espressione di Ki-67 è apparso inoltre influenzato dall'eventuale compresenza nel campione di epiteliosi e di segni di invasione del sistema linfatico, in modo rispettivamente significativo ($P < 0.05$) e marginalmente significativo ($P = 0.06$). L'insieme delle popolazioni tumorali di campioni in cui era stata diagnosticata anche l'epiteliosi presentavano un'espressione media di Ki-67 maggiore rispetto all'insieme delle popolazioni neoplastiche ad essa non associate. Similmente in caso di presenza di invasione del sistema linfatico, le popolazioni tumorali presentavano un'espressione media di Ki-67 più elevata (Tabella 13).

Infine, nelle diverse popolazioni tumorali si è indagata anche l'eventuale sovraespressione del recettore HER-2. Questa è stata identificata (punteggio 2+) solo a carico della popolazione epiteliale luminale di 3 carcinomi complessi, di 2 carcinomi semplici e di 1 carcinoma e mioepitelioma maligno. Nel complesso non si sono osservate differenze statisticamente significative di espressione di questo recettore nelle diverse popolazioni tumorali esaminate.

4.2.2 Studio prognostico A

I 229 tumori compresi in questo studio provenivano da una popolazione di cani di età media pari a 9.6 anni (*range*: 3-16 anni) che erano per la maggior parte interi (63.3%) e di razza pura (58.6%). Il 12.2% dei soggetti ha sviluppato recidive e il 28.4% metastasi a distanza nel corso del primo anno post-intervento chirurgico. Il 34.5% degli animali sono deceduti, nel 79.7% dei casi per cause associate al tumore. L'85.7% dei soggetti morti per tumore sono vissuti meno di 1 anno. I tumori analizzati appartenevano ai sottotipi tumorali che vengono riportati in Tabella 14 con le relative numerosità. I casi di carcinoma e mioepitelioma maligno erano

stati tutti confermati con l'esame immunohistochimico nell'ambito dello studio classificativo-epidemiologico.

Tabella 14. Numerosità dei sottotipi tumorali analizzati.

Sottotipo tumorale	Numero di casi
Adenoma semplice	20
Adenoma complesso	20
Tumore misto benigno	20
Carcinoma complesso	23
Carcinoma semplice solido	20
Carcinoma e mioepitelioma maligno	20
Carcinoma anaplastico	18
Carcinoma comedonico	17
Carcinoma semplice tubulare	15
Carcinoma in tumore misto benigno	14
Carcinoma semplice tubulo-papillare	12
Carcinoma papillare intraduttale/carcinoma duttale	12
Carcinoma adenosquamoso	10
Carcinosarcoma	8
Totale	229

Nell'arco di tempo in cui sono stati monitorati, i soggetti con diagnosi di adenoma semplice, adenoma complesso, tumore misto benigno, carcinoma in tumore misto benigno e carcinoma semplice tubulare non hanno sviluppato né recidive né metastasi a distanza. Nessuno di questi, inoltre, è deceduto nell'arco del periodo di raccolta dei dati di *follow-up*. Tali soggetti, pertanto, non sono stati inclusi nelle analisi relative al rischio di decesso o di sviluppo di recidive e metastasi riportate di seguito.

Per i restanti 140 tumori, si sono osservate, in funzione del sottotipo tumorale, differenze di sopravvivenza che vengono illustrate dalle curve rappresentate in Figura 11.

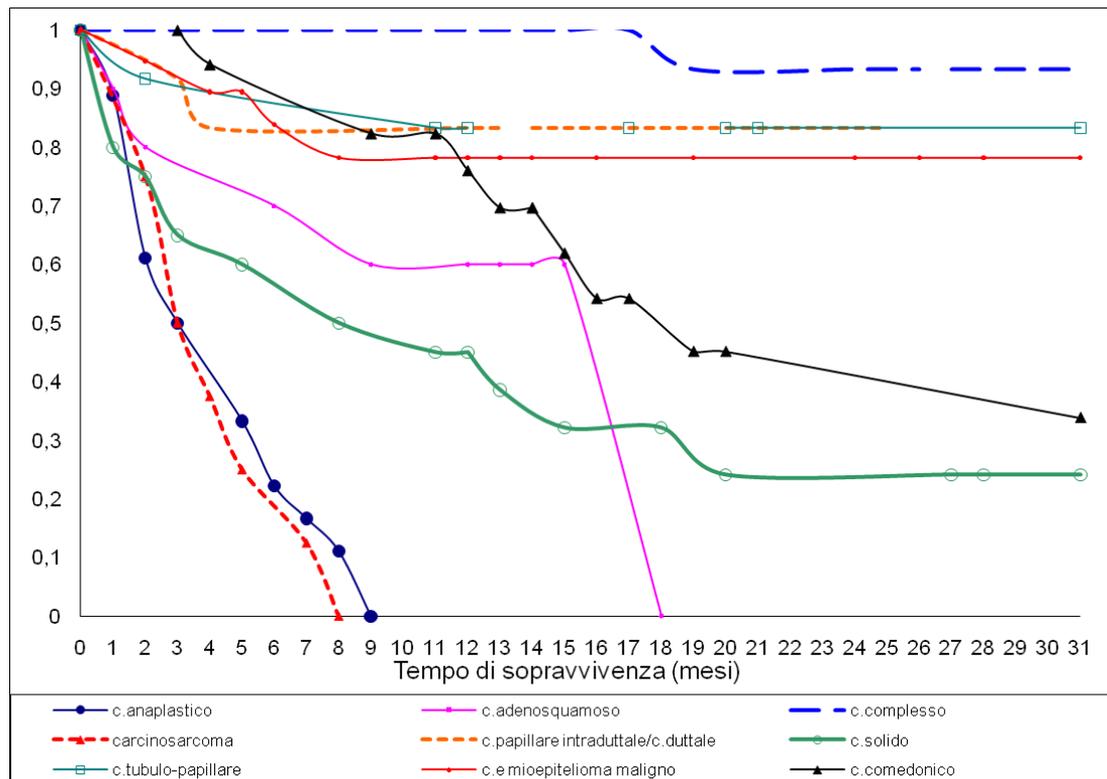


Figura 11. Curve di sopravvivenza per i vari sottotipi tumorali stimate col metodo di Kaplan-Meier.

Il carcinoma complesso presentava l'andamento migliore con una sopravvivenza a 31 mesi pari al 93%. Il carcinoma semplice tubulo-papillare e il gruppo carcinoma papillare intraduttale/carcinoma duttale presentavano invece a 31 mesi una sopravvivenza pari all'83%. Per il carcinoma e mioepitelioma maligno dopo 4 mesi la sopravvivenza si riduceva all'89% e dopo 8 mesi al 78%, senza poi calare ulteriormente. Il carcinoma comedonico era caratterizzato a 12 mesi da una sopravvivenza pari al 76%, che diminuiva ancora successivamente fino a raggiungere, a 31 mesi, un valore del 33%. Il carcinoma semplice solido presentava un andamento ancora più sfavorevole con sopravvivenza a 12 mesi e 31 mesi rispettivamente pari a 45% e 24%. Per quanto riguarda il carcinoma adenosquamoso, questo ha mostrato fino a 15 mesi un andamento intermedio tra il carcinoma comedonico e il carcinoma solido e, successivamente, una brusca riduzione della sopravvivenza che da un valore del 60% è scesa a zero. La sopravvivenza peggiore si è osservata per i carcinosarcomi e

per i carcinomi anaplastici. Questi, già dopo 3 mesi, avevano una sopravvivenza ridotta al 50% che si azzerava rispettivamente a 8 mesi e 9 mesi.

Sono stati utilizzati modelli di regressione di Cox a rischi proporzionali per confrontare le curve e stimare l'entità delle differenze, a parità delle altre variabili potenzialmente in grado di influenzare la sopravvivenza. Nell'ambito di questa analisi si è utilizzato il carcinoma complesso come categoria di riferimento. Rispetto a questo, l'unico tumore che ha presentato un rischio di morte maggiore, significativo da un punto di vista statistico ($P < 0.05$, HR=15.84, IC=1.88-133.41), era il carcinosarcoma. Per altri sottotipi tumorali, nonostante i valori di P fossero solo marginalmente significativi, è stato sospettato un effetto sfavorevole sulla sopravvivenza visti gli intervalli di confidenza ampi spostati verso valori alti e con limiti inferiori prossimi all'1 [carcinoma anaplastico ($P=0.17$, HR:=6.89, IC=0.65-72.80), il carcinoma semplice solido ($P=0.16$, HR=5.62, IC=0.71-44.18) e il carcinoma e mioepitelioma maligno ($P=0.13$, HR=5.47, IC=0.83-36.06)].

Quando con la regressione logistica si è studiata la probabilità degli animali di vivere meno di un anno dopo l'intervento chirurgico, è stato sospettato, per le medesime ragioni riportate sopra, un effetto negativo sulla sopravvivenza per il carcinoma e mioepitelioma maligno ($P=0.11$, OR=7.58, IC=0.89-64.24). Questa forma neoplastica, inoltre, ha dimostrato, rispetto al carcinoma complesso, un rischio significativamente più elevato di determinare la formazione di metastasi a distanza ($P < 0.05$, OR=8.77, IC=1.05-73). In aggiunta, si è ipotizzato un maggiore rischio di metastatizzazione per il carcinoma comedonico ($P \leq 0.12$, OR=13.73, IC=0.82-227.54) e per il carcinoma semplice solido ($P=0.18$, OR=0.96, IC=0.56-163.21). Rispetto allo sviluppo di recidive, non si sono invece evidenziate significative differenze tra i sottotipi tumorali.

Dei 140 tumori esaminati, il 42.9% erano di grado I, il 14.2% di grado II e il 42.9% di grado III. Non sono emerse differenze significative in termini di *follow-up* tra i tumori di

grado I e quelli di grado II. È stato invece attribuito un significato prognostico negativo indipendente al grado III che, rispetto agli altri due, era associato ad un rischio 4 volte maggiore di morte per tumore ($P < 0.05$, $RR = 3.87$, $IC = 1.57-9.54$). Gli animali con tumori di grado III erano molto più predisposti, rispetto agli altri, a sviluppare metastasi a distanza ($P < 0.05$, $OR = 52.44$, $IC = 2.48 \rightarrow 1000$). Queste infatti sono state diagnosticate nell'80% dei cani con carcinomi di grado III, contro il 15% e il 21.7% dei cani rispettivamente con carcinomi di grado I e di grado II. Per i cani con tumori di grado III era più elevato il rischio di decesso entro l'anno ($P < 0.05$, $OR = 20.61$, $IC = 2.17-195.58$) che si è verificato nel 73.3% dei casi. Tra i soggetti portatori di tumori di grado I e di grado II questa evenienza si è verificata più di rado, rispettivamente nel 5% e nel 21.7% dei casi. Rispetto all'insorgenza di recidive non si sono invece evidenziate differenze significative tra tumori di grado diverso.

Nel gruppo di tumori esaminati il diametro medio era pari a 2.1 cm (*range*: 0.2-8 cm). Come il grado di malignità, anche il diametro tumorale è risultato un importante fattore prognostico indipendente che influenzava la sopravvivenza dei soggetti con aumento del 30% circa del rischio di morte per tumore ad ogni incremento di 1 cm ($P < 0.05$, $RR = 1.29$, $IC = 1.10-1.51$). Il diametro sembrava tuttavia non influenzare direttamente il rischio di recidive o di metastasi a distanza.

I margini di escissione erano interessati dal processo neoplastico nel 27.1% dei casi. I soggetti con tumori estesi al margine avevano, rispetto a quelli con tumori asportati completamente, un rischio maggiore di vivere meno di un anno ($P < 0.05$, $OR = 3.87$, $IC = 1.31-11.42$). Il coinvolgimento dei margini di escissione non è risultato tuttavia essere un significativo fattore predittivo indipendente del rischio di morte per tumore e del rischio di sviluppo di recidive o metastasi.

Per quanto riguarda l'attività mitotica, si sono indagate prima di tutto le differenze in funzione del sottotipo tumorale e della specifica sottopopolazione cellulare (in caso di tumori

con doppia popolazione cellulare). Questa analisi è stata condotta su tutti i campioni, compresi i casi di adenoma semplice, adenoma complesso, tumore misto benigno, carcinoma in tumore misto benigno e carcinoma semplice tubulare. Si sono notate differenze statisticamente significative ($P < 0.0001$) di attività mitotica media che vengono mostrate in Tabella 15.

Tabella 15. Analisi della varianza dell'attività mitotica in funzione del sottotipo tumorale e della specifica popolazione tumorale (nei tumori con doppia popolazione cellulare). R-quadro=0.65; Media quadratica dell'errore=22.99; Valore F=13.02; $P < 0.0001$.

Sottotipo tumorale		Medie MQ* (mitosi su 10 campi al 40X)
Adenoma semplice		1
Carcinoma semplice solido		16.1
Carcinoma anaplastico		15.2
Carcinoma comedonico		21.7
Carcinoma semplice tubulare		5.4
Carcinoma semplice tubulo-papillare		7.4
Carcinoma papillare intraduttale/carcinoma duttale		9.5
Carcinoma adenosquamoso		12.5
Adenoma complesso	Epit.	0.6
	Mioepit.	0
Carcinoma complesso	Epit.	6.2
	Mioepit.	0.2
Carcinoma e mioepitelioma maligno	Epit.	4.1
	Mioepit.	13.4
Tumore misto benigno	Epit.	0.8
	Mioepit./Mesenc.	0.1
Carcinoma in tumore misto benigno	Epitel.	5.5
	Mioepit./Mesenc.	0.1
Carcinosarcoma	Epit.	6.4
	Mesenc.	23.7

*Medie MQ = medie dei minimi quadrati; "Epit." = popolazione epiteliale luminale; "Mioepit." = popolazione mioepiteliale interstiziale; "Mioepit./Mesenc." = popolazione mioepiteliale/mesenchimale interstiziale.

I valori medi più elevati di attività mitotica si sono riscontrati a carico della componente mesenchimale dei carcinosarcomi, nei carcinomi comedonici, nei carcinomi semplici solidi,

nei carcinomi anaplastici e nella componente mioepiteliale dei carcinomi e mioepiteliomi maligni. I valori medi più bassi si sono osservati, invece, nella componente mioepiteliale degli adenomi complessi, dei tumori misti benigni, dei carcinomi complessi e dei carcinomi in tumore misto benigno.

L'attività mitotica, come le altre variabili sopra considerate, è stata poi messa in relazione con i dati di *follow-up* raccolti. Si è scelto di prendere in considerazione, per i tumori con doppia popolazione cellulare, il valore maggiore di attività mitotica calcolato che di fatto era sempre quello della popolazione mioepiteliale nei casi di carcinoma e mioepitelioma maligno, mentre era sempre quello della componente epiteliale nei casi di adenoma complesso, carcinoma complesso, tumore misto benigno e carcinoma in tumore misto benigno. Nei casi di carcinosarcoma il valore maggiore di attività mitotica era invece sempre quello riferito alla componente mesenchimale. Dalle analisi statistiche effettuate l'attività mitotica non è risultata essere un fattore in grado di influenzare in modo significativo ed indipendente il *follow-up* dei soggetti, né in termini di sopravvivenza, né di rischio di recidive o di metastatizzazione a distanza.

Nel 9.3% dei tumori analizzati si è osservata la presenza di epiteliosi alla periferia del tumore. I soggetti che presentavano questo reperto non avevano tuttavia un *follow-up* significativamente diverso dagli altri.

Un'altra variabile considerata nell'ambito di questo studio prognostico è stata l'invasione del sistema linfatico che si è osservata nel 37.1% dei tumori esaminati. La presenza di invasione linfatica non influenzava la probabilità di sviluppo di recidive, ma costituiva invece un importante fattore prognostico indipendente che modificava la sopravvivenza dei soggetti. In caso di invasione linfatica, infatti, vi era un rischio quasi 2 volte e mezzo maggiore di morte per il tumore ($P < 0.05$, $RR = 2.45$, $IC = 1.09-5.47$). Aumentava inoltre in modo significativo la probabilità che l'animale visse meno di 1 anno ($P = 0.07$,

OR=4.28, IC=1.12-16.28) e che sviluppasse metastasi a distanza (P=0.06, OR:4.45, IC=1.17-16.87).

Quando l'invasione del sistema linfatico è stata inclusa come variabile esplicativa nei modelli di regressione di Cox e di regressione logistica si è notato che veniva persa la significatività statistica del grado III come fattore predittivo del rischio di morte per tumore, di metastatizzazione e di sopravvivenza inferiore ad 1 anno.

Si sono invece confermate le associazioni tra il diametro tumorale e il rischio di morte (P<0.05, OR:1.30, IC: 1.11-1.52) e tra l'interessamento dei margini di escissione e la sopravvivenza inferiore ad 1 anno (P<0.05, OR:3.55, IC: 1.16-10.87). Anche tutte le associazioni e le sospette associazioni tra i sottotipi tumorali e il *follow-up* sono state confermate nei modelli che prendevano in considerazione anche l'invasione linfatica.

Infine, l'età, la razza e la sterilizzazione dei soggetti non hanno mostrato alcuna significativa valenza in termini prognostici.

4.2.3 Studio prognostico B

I 245 carcinomi selezionati per questo studio sono stati raccolti durante un soggiorno-studio presso il *Laboratory of Pathology and Toxicology* della *University of Pennsylvania (School of Veterinary Medicine)*, Philadelphia, USA. Questi provenivano da una popolazione di cani di età media pari a 7 anni (*range*: 5-19 anni) che erano per la maggior parte sterilizzati (55.1%) e di razza pura (77.2%). I carcinomi sono stati classificati secondo i criteri della "Classificazione WHO-modificata". In 18 casi, vista nuovamente la presenza di una popolazione interstiziale pleomorfa associata ad una popolazione epiteliale luminale organizzata in tubuli, sono state effettuate analisi immunohistochimiche (CK8/18, CK14, CALP, VIM e p63) a fini classificativi. In 17/18 casi è stata formulata una diagnosi finale di

carcinoma (+ CK8/18, CK14) e mioepitelioma maligno (+ CK14, CALP, VIM e p63). In 1/17 casi invece il tumore è stato classificato come carcinosarcoma vista l'esclusiva positività della popolazione epiteliale luminale e di quella pleomorfa interstiziale rispettivamente per CK8/18 e VIM. In Tabella 16 vengono riportati i sottotipi tumorali diagnosticati in questo studio con le relative numerosità.

Tabella 16. Numerosità dei sottotipi tumorali analizzati.

Sottotipo tumorale	Numero di casi
Carcinoma comedonico	50
Carcinoma semplice tubulare	45
Carcinoma anaplastico	36
Carcinoma semplice solido	31
Carcinoma semplice tubulo-papillare	28
Carcinoma e mioepitelioma maligno	17
Carcinoma complesso	10
Carcinoma duttale	7
Carcinoma in tumore misto benigno	5
Carcinoma micropapillare invasivo	5
Carcinoma adenosquamoso	4
Carcinoma papillare intraduttale	3
Carcinoma con cellule ricche in lipidi	3
Carcinosarcoma	1
Totale	245

Il 77.5% dei tumori analizzati presentava invasione dei vasi linfatici. Il tessuto linfonodale era disponibile in 127 casi e in 76 di questi (59.8%) si sono riconosciute metastasi. In presenza di metastasi si è sempre osservata anche invasione vascolare, ad eccezione di 4 casi. Viceversa, quando c'era invasione vascolare e il tessuto linfonodale era disponibile (74 casi), si sono rinvenute sempre anche metastasi linfonodali tranne che in 2 casi.

Le frequenze di invasione dei vasi linfatici e di metastasi linfonodale per ciascun sottotipo tumorale sono rispettivamente riportate in Tabella 17 e Tabella 18 in cui vengono riportati

anche i dati di *grading* delle neoplasie, effettuati secondo due diversi metodi (Misdorp, 2002; Clemente *et al.*, 2010).

Tabella 17. Frequenza di invasione dei vasi linfatici per sottotipo tumorale e grado istologico (secondo Misdorp e Clemente) (Misdorp, 2002; Clemente *et al.*, 2010). “C.”=carcinoma.

Sottotipo tumorale	Invasione dei vasi linfatici						Totale
	Misdorp			Clemente			
	Grado I	Grado II	Grado III	Grado I	Grado II	Grado III	
C.comedonico	5/7 (71.4%)	22/23 (95.6%)	20/20 (100%)	-	14/16 (87.5%)	33/34 (97.1%)	47/50 (94%)
C.tubulare semplice	17/30 (56.7%)	10/15 (66.7%)	-	2/11 (18.2%)	20/28 (71.4%)	5/6 (83.3%)	27/45 (60%)
C.anaplastico	-	-	36/36 (100%)	-	-	36/36 (100%)	36/36 (100%)
C.semplice solido	-	17/20 (85%)	10/11 (90.9%)	-	7/10 (70%)	20/21 (95.2%)	27/31 (87.1%)
C.semplice tubulo-papillare	8/11 (72.7%)	13/15 (86.7%)	2/2 (100%)	1/3 (33.3%)	18/20 (90%)	4/5 (80%)	23/28 (82.14%)
C.e mioepitelioma maligno	7/11 (63.6%)	6/6 (100%)	-	4/6 (66.6%)	8/10 (80%)	1/1 (100%)	13/17 (76.5%)
C.complesso	1/8 (12.5%)	1/2 (50%)	-	0/5 (0%)	2/5 (40%)	-	2/10 (20%)
C.duttale	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/4 (0%)	1/2 (50%)	1/7 (14.3%)
C. in tumore misto benigno	0/4 (0%)	1/1 (100%)	-	0/3 (0%)	1/2 (50%)	-	1/5 (20%)
C.micropapillare invasivo	-	2/2 (100%)	3/3 (100%)	-	1/1 (100%)	4/4 (100%)	5/5 (100%)
C.adenosquamoso	-	2/2 (100%)	2/2 (100%)	-	-	4/4 (100%)	4/4 (100%)
C.papillare intraduttale	1/3 (33.3%)	-	-	0/1 (0%)	1/2 (50%)	-	1/3 (33.3%)
C.con cellule ricche in lipidi	-	1/1 (100%)	2/2 (100%)	-	1/1 (100%)	2/2 (100%)	3/3 (100%)
Carcinosarcoma	0/1 (0%)	-	-	-	0/1 (0%)	-	0/1 (0%)
Totale	39/78 (50%)	75/90 (83.3%)	76/77 (98.7%)	6/30 (20%)	74/100 (74%)	110/115 (95.6%)	190/245 (77.5%)

Tabella 18. Frequenza di metastasi linfonodale per sottotipo tumorale e grado istologico (secondo Misdorp e Clemente) (Misdorp, 2002; Clemente *et al.*, 2010). n*=numero di casi con linfonodo disponibile, "C."=carcinoma.

Sottotipo tumorale (n*)	Metastasi linfonodale						
	Misdorp			Clemente			Totale
	Grado I	Grado II	Grade III	Grado I	Grado II	Grado III	
C.semplice tubulare (n:26)	3/17 (17.6%)	4/9 (44.4%)	-	1/10 (10%)	4/13 (30.8%)	2/3 (66.7%)	7/26 (26.9%)
C.comedonico (n:18)	1/3 (33.3%)	12/12 (100%)	3/3 (100%)	-	5/7 (71.4%)	11/11 (100%)	16/18 (88.9%)
C.anaplastico (n:16)	-	-	16/16 (100%)	-	-	16/16 (100%)	16/16 (100%)
C.semplice tubulo-papillare (n:14)	4/7 (57.1%)	4/6 (66.7%)	1/1 (100%)	0/2 (0%)	7/9 (77.8%)	2/3 (66.7%)	9/14 (64.3%)
C.semplice solido (n:13)	-	4/7 (57.1%)	6/6 (100%)	-	0/3 (0%)	10/10 (100%)	10/13 (76.9%)
C.e mioepitelioma maligno (n:9)	3/5 (60%)	4/4 (100%)	-	1/2 (50%)	5/6 (83.3%)	1/1 (100%)	7/9 (77.7%)
C. complesso (n:9)	0/7 (0%)	1/2 (50%)	-	0/5 (0%)	1/4 (25%)	-	1/9 (11.1%)
C. duttale (n:6)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/1 (0%)	0/3 (0%)	1/2 (50%)	1/6 (16.7%)
C. in tumore misto benigno (n:5)	1/4 (25%)	0/1 (0%)	-	0/3 (0%)	1/2 (50%)	-	1/5 (20%)
C.papillare intraduttale (n:3)	1/3 (33%)	-	-	0/1 (0%)	1/2 (50%)	-	1/3 (33.3%)
C. con cellule ricche in lipidi (n:3)	-	1/1 (100%)	2/2 (100%)	-	1/1 (100%)	2/2 (100%)	3/3 (100%)
C. micropapillare invasivo (n:2)	-	1/1 (100%)	2/2 (100%)	-	-	2/2 (100%)	2/2 (100%)
C.adenosquamoso (n:2)	-	1/1 (100%)	1/1 (100%)	-	-	2/2 (100%)	2/2 (100%)
Carcinosarcoma (n:1)	0/1 (0%)	-	-	-	0/1 (0%)	-	0/1 (0%)
Totale (n:127)	13/49 (26.5%)	32/46 (69.6%)	31/32 (96.9%)	2/24 (8.3%)	25/51 (49%)	49/52 (94.2%)	76/127 (59.8%)

Nei carcinomi anaplastici, nei carcinomi micropapillari invasivi, nei carcinomi adenosquamosi e nei carcinomi con cellule ricche in lipidi l'invasione dei vasi linfatici e le metastasi linfonodali sono state riscontrate nel 100% dei casi. Altre tipologie tumorali, come il carcinoma comedonico, il carcinoma semplice solido, il carcinoma semplice tubulo-papillare e il carcinoma e mioepitelioma maligno hanno presentato frequenze di invasione dei vasi e del linfonodo comunque elevate. Erano invece più basse quelle dei carcinomi semplici tubulari e dei carcinomi papillari intraduttali. I tumori che meno spesso hanno invaso il sistema linfatico erano i carcinomi complessi, i carcinomi duttali ed i carcinomi in tumore misto benigno.

Alcune tipologie tumorali (carcinoma micropapillare invasivo, carcinoma adenosquamoso, carcinoma con cellule ricche in lipidi, carcinoma papillare intraduttale e carcinosarcoma), vista l'esiguità dei casi, sono state escluse dalle analisi statistiche. I restanti sottotipi tumorali sono stati inclusi in due modelli lineari generalizzati che si sono dimostrati significativi nello spiegare la presenza/assenza di invasione dei vasi linfatici ($P < 0.01$) e di metastasi linfonodali ($P < 0.01$).

Le cellule neoplastiche rinvenute nei vasi linfatici e nel linfonodo presentavano un'organizzazione ed aspetti citomorfologici analoghi a quelli delle cellule neoplastiche della massa tumorale primaria. È interessante notare che nei carcinomi e mioepiteliomi maligni gli emboli nei vasi linfatici erano composti nella maggior parte dei casi da entrambe le popolazioni tumorali (50%) o solo da quella mioepiteliale maligna (41.7%), mentre più raramente erano visibili nel lume vascolare linfatico solo cellule della componente carcinomatosa (8.3%). Analogamente, le metastasi linfonodali erano prevalentemente composte da tutte e due le popolazioni tumorali (50%) o solo da quella mioepiteliale (33.3%). Al contrario, nei 2 casi di carcinoma complesso con invasione vascolare linfatica compresi in

questo studio gli emboli erano composti esclusivamente dalle cellule del carcinoma, senza alcun coinvolgimento della componente mioepiteliale.

I risultati relativi alla presenza di infiltrazione delle cellule neoplastiche nello stroma mammario circostante, di “*vasculogenic mimicry*” e di pattern micropapillare vengono riassunti in Tabella 19. Alcuni esempi di questi aspetti istologici sono riportati in appendice fotografica. Sinteticamente, nel 69.4% dei tumori esaminati si è osservata infiltrazione delle cellule neoplastiche nello stroma mammario circostante il nodulo tumorale. La crescita infiltrante si è riscontrata sempre nei carcinomi anaplastici e in quelli micropapillari invasivi; era inoltre evidente nella maggior parte dei carcinomi comedonici, dei carcinomi adenosquamosi, dei carcinomi semplici solidi e dei carcinomi semplici tubulari. La presenza di infiltrazione era significativamente associata sia all’invasione dei vasi linfatici ($P<0.001$) sia alla presenza di metastasi linfonodali ($P<0.001$).

Il “*vasculogenic mimicry*” è stato identificato nel 13.1% di tutte le lesioni tumorali, con una frequenza relativamente elevata nel carcinoma anaplastico e più bassa nelle altre tipologie tumorali (Tabella 19). La presenza di questo particolare aspetto morfologico non era significativamente associata né all’invasione dei vasi linfatici né al coinvolgimento del linfonodo.

Il pattern micropapillare è stato osservato nel 22% dei tumori studiati. Oltre al carcinoma micropapillare invasivo, che per definizione è caratterizzato da un pattern micropapillare in più del 50% delle cellule tumorali, anche altre forme neoplastiche hanno in certi casi presentato questo aspetto in aree focali/multifocali del tumore (Tabella 19). Tra queste vi erano il carcinoma semplice tubulo-papillare, il carcinoma papillare intraduttale e il carcinoma comedonico. La presenza nei tumori di pattern micropapillare era significativamente associata sia all’invasione dei vasi linfatici ($P<0.05$) che a quella linfonodale ($P<0.05$).

Tabella 19. Frequenze di infiltrazione, *vasculogenic mimicry* e pattern micropapillare per sottotipo tumorale.

Sottotipo tumorale	Numero e percentuale di casi		
	Infiltrazione	Vasculogenic mimicry	Pattern micropapillare
Carcinoma comedonico	43 (86%)	5 (10%)	11 (22%)
Carcinoma semplice tubulare	34 (75.5%)	5 (11.1%)	5/45 (11.1%)
Carcinoma anaplastico	36 (100%)	15 (41.7%)	6 (16.7%)
Carcinoma semplice solido	21 (67.7%)	3 (9.7%)	5 (16.1%)
Carcinoma semplice tubulo-papillare	14 (50%)	2 (7.1%)	21 (75%)
Carcinoma e mioepitelioma maligno	8 (47.1%)	1 (5.9%)	0 (0%)
Carcinoma complesso	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
Carcinoma duttale	3 (42.8%)	0 (0%)	0 (0%)
Carcinoma in tumore misto benigno	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Carcinoma micropapillare invasivo	5 (100%)	1 (20%)	5 (100%)
Carcinoma adenosquamoso	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)
Carcinoma papillare intraduttale	1 (33.3%)	0 (0%)	1 (33.3%)
Carcinoma con cellule ricche in lipidi	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Carcinosarcoma	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Totale	170 (69.4%)	32 (13.1%)	54 (22%)

In Figura 12 è schematizzata la distribuzione dei carcinomi dello studio nei tre gradi di malignità secondo i due diversi sistemi di *grading* utilizzati (sistema di Misdorp e sistema di Clemente, quest'ultimo precedentemente impiegato nell'ambito dello studio classificativo-epidemiologico e dello studio prognostico A). Col sistema di Misdorp, rispetto a quello di Clemente, un maggior numero di tumori sono stati classificati come grado I e un minor numero di tumori come grado II e III.

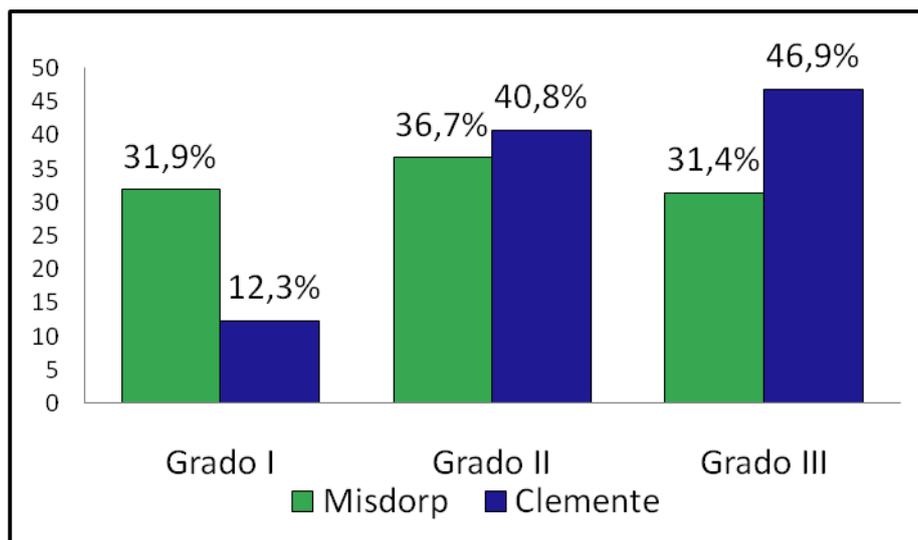


Figura 12. Classificazione dei carcinomi nei tre gradi di malignità utilizzando il sistema di Misdorp e il sistema di Clemente.

Le frequenze di invasione vascolare linfatica e di metastasi linfonodale nei tumori a diverso grado di malignità sono riportate in Tabella 17 e in Tabella 18. Indipendentemente dal sistema utilizzato, si è osservato che i tumori di grado III presentavano una frequenza maggiore di invasione dei vasi linfatici e del linfonodo rispetto ai tumori di grado II e questi ultimi rispetto ai tumori di grado I. Utilizzando il sistema di Misdorp si è però notato che le differenze di frequenza di invasione dei vasi linfatici e del linfonodo tra tumori appartenenti ai tre diversi gradi di malignità erano meno evidenti. Il sistema di Clemente era invece maggiormente in grado di discriminare tra tumori con diversa tendenza ad invadere il sistema linfatico.

Un aspetto interessante emerso dal confronto dei due sistemi riguardava in particolare la frequenza di invasione dei vasi linfatici nei tumori di grado I, che era pari al 20% quando questi venivano definiti secondo Clemente, mentre saliva al 50% utilizzando i criteri di classificazione di Misdorp. In ogni caso entrambi i sistemi di *grading* si sono rivelati significativi modelli per la predizione della presenza di invasione dei vasi linfatici e di metastasi linfonodali, anche se quello di Clemente, presentando valori di AIC più bassi, ha mostrato una maggiore efficienza predittiva (Tabella 20).

Tabella 20. Risultati dei modelli lineari generalizzati (GLM) che hanno testato l'associazione dei due sistemi di *grading* (Misdorp e Clemente) con l'invasione dei vasi linfatici e con le metastasi linfonodali.

	Stima	SE	Valore Z	RD	P	AIC
Invasione dei vasi linfatici						
Misdorp	1.9020	0.3206	5.932	188.56	<0.001	192.56
Clemente	2.3714	0.3502	6.772	169.80	<0.001	173.80
Metastasi linfonodali						
Misdorp	2.538	0.4225	6.007	106.69	<0.001	110.69
Clemente	2.9031	0.5232	5.548	100.64	<0.001	104.64

SE= errore standard, RD= devianza residua, AIC= valore del test di verifica delle informazioni di Akaike.

Infine, la classificazione in sottotipi tumorali, l'infiltrazione periferica, il pattern micropapillare e il sistema di *grading* di Clemente sono stati testati simultaneamente per identificare il miglior modello in grado di predire la presenza/assenza di invasione vascolare linfatica e di metastasi linfonodali. Le quattro variabili così testate hanno mantenuto la significatività statistica ($P < 0.05$). Il modello migliore per predire l'invasione dei vasi linfatici e del linfonodo si è rivelato pertanto quello che le comprendeva tutte, classificava cioè i tumori in sottotipi e in gradi di malignità secondo Clemente e considerava in aggiunta anche l'eventuale presenza di infiltrazione e di pattern micropapillare.

5. DISCUSSIONE

Questo lavoro di dottorato, come parte di una più ampia collaborazione internazionale, ha portato alla stesura di una nuova classificazione per le neoplasie e iperplasie/displasie della mammella del cane basata su criteri morfologici definiti e standardizzati. Applicando questi criteri su 2143 campioni di tessuto mammario canino e analizzando i risultati ottenuti in relazione ad altre specifiche valutazioni morfologiche, a dati segnaletici e di *follow-up* è stato possibile mettere in evidenza alcuni aspetti, in parte noti e in parte nuovi, relativi all'epidemiologia e al comportamento biologico del tumore mammario del cane che vengono di seguito discussi.

L'età media della popolazione di cani esaminata nell'ambito dello studio classificativo-epidemiologico era pari a 9.2 anni. Questo dato conferma quanto già presente in letteratura circa la predisposizione dei cani adulto-anziani allo sviluppo di patologie proliferative della mammella. È stato interessante osservare al crescere dell'età degli animali una riduzione dell'incidenza delle lesioni iperplastiche/displastiche che si sono rivelate predisponenti allo sviluppo di tumori benigni. All'aumentare dell'età si è notato inoltre un aumento del diametro medio dei tumori e, in particolare, un incremento di incidenza di forme maligne, soprattutto di grado II e di grado III, con invasione del sistema linfatico. Con l'età aumenta anche la frequenza dell'epiteliosi che si è rivelata un fattore di rischio per lo sviluppo proprio delle forme tumorali maligne. Il fatto che si siano diagnosticati tumori con caratteristiche istologiche di maggiore malignità negli animali più anziani potrebbe essere dovuto ad una maggiore aggressività delle forme neoplastiche che si sviluppano in età avanzata oppure al fatto che tali tumori potrebbero essere stati asportati più tardivamente quindi in uno stadio più avanzato della progressione neoplastica.

Nonostante la tendenza relativa all'età appena descritta, si è notato un picco di incidenza di tumori maligni e di invasione linfatica negli animali in assoluto più giovani della popolazione (di età pari o inferiore a 5 anni). Questo reperto suggerisce un'analogia con le forme tumorali della mammella della donna che quando insorgono in giovane età presentano, per ragioni non ancora del tutto chiare, spiccata aggressività ed elevata capacità metastatizzante (Beadle *et al.*, 2011).

Pur considerate le associazioni appena descritte, l'età non è stata identificata come fattore prognostico indipendente in cani affetti da tumori mammari.

Dallo studio classificativo-epidemiologico sono emerse alcune considerazioni interessanti relative alla razza. Si è visto che la maggior parte dei soggetti con lesioni mammarie erano di razza pura; i soggetti meticci erano colpiti meno frequentemente. Il maggior rischio di consanguineità e quindi di omozigosi per i soggetti appartenenti a razze pure potrebbe spiegare perché questi sembrano apparentemente più predisposti allo sviluppo di lesioni proliferative mammarie. I gruppi di razza più rappresentati nella popolazione esaminata erano i terrier (gruppo 3) e i cani da pastore e bovani (gruppo 1), come riportato in altri studi analoghi (Sorenmo, 2003; Engenvall *et al.*, 2005; Brønden *et al.*, 2010). Non essendo disponibili dati precisi di distribuzione e frequenza dei gruppi di razza sul territorio italiano nazionale e regionale, non è possibile però trarre conclusioni definitive relativamente all'eventuale predisposizione di questi animali allo sviluppo di lesioni mammarie, in quanto essi potrebbero essere prevalenti nella popolazione studiata semplicemente perché maggiormente diffusi sul territorio.

Confrontando però le razze tra loro è stato interessante notare un rischio significativamente inferiore di tumore maligno per i cani meticci, per i terrier (gruppo 3) e per i bassotti (gruppo 4). I soggetti dei gruppi 3 e 4 avevano anche un diametro medio tumorale

inferiore rispetto agli altri animali. Tali risultati sono simili a quanto messo in evidenza in uno studio precedente (Itoh *et al.*, 2004). Alla base di queste differenze potrebbero essere considerate cause genetiche o legate alla sfera ormonale. I cani terrier e i bassotti sono generalmente animali di piccola taglia pertanto si può anche ipotizzare che il ruolo svolto dall'asse GH-IGF-1 sia meno preponderante in questi animali nella progressione tumorale (Selman *et al.*, 1994; Stovring *et al.*, 1997; Mol *et al.*, 1999; Gregoraszczyk *et al.*, 2001). In aggiunta, va anche tenuto presente che le differenze di razza osservate potrebbero essere riferibili, almeno in parte, come per la donna, a differenze nello “stile di vita” degli animali. I cani terrier e meticci, in particolare proprio per la taglia ridotta, vivono solitamente a stretto contatto con i proprietari, frequentemente in casa e spesso sono tenuti in braccio. Sono quindi generalmente monitorati con attenzione dal proprietario che più facilmente potrà accorgersi della presenza di noduli, anche piccoli, a livello della regione mammaria.

In accordo con la letteratura, la maggior parte delle lesioni mammarie di questo lavoro sono state diagnosticate in cani interi. Questo conferma l'ipotesi di un ruolo importante svolto dagli ormoni ovarici nei disordini proliferativi della mammella in questa specie. In ogni caso, il 24.2% delle lesioni dello studio classificativo-epidemiologico provenivano da animali sterilizzati. Pur non essendo nota per questi soggetti l'età della sterilizzazione, possiamo presumere che questa sia stata effettuata tardivamente visto che, in caso di sterilizzazione precoce, il rischio di sviluppare lesioni proliferative mammarie è molto basso (Schneider *et al.*, 1969; Taylor *et al.*, 1976; Misdorp, 1988; Sonnenschein *et al.*, 1991). Questi soggetti hanno presentato, rispetto agli animali interi, una frequenza più elevata di tumori maligni, soprattutto di carcinomi semplici solidi, di tumori di grado II e III e di invasione linfatica. I soggetti interi, viceversa, avevano più lesioni iperplastiche/displastiche e tumori con componente mioepiteliale benigna (tumori complessi e misti). Si può ipotizzare quindi un

ruolo differente del segnale ormonale nei due gruppi di animali. In particolare nei soggetti sterilizzati la crescita neoplastica, non essendo sotto il controllo degli ormoni ovarici, potrebbe associarsi ad aspetti morfologici più aggressivi, come descritto per i carcinomi della mammella della donna negativi per i recettori ormonali; invece la continua stimolazione ormonale in soggetti interi porterebbe sì a un rischio maggiore di sviluppo neoplastico, ma con una differenziazione cellulare meno distante dalla ghiandola normale e quindi con caratteristiche di minor aggressività della neoplasia stessa. In ogni caso, pur risultando evidente una certa influenza della sterilizzazione sulla presentazione delle lesioni mammarie, questa non appare influire in modo significativo ed indipendente sul *follow-up* dei soggetti.

In letteratura la crescita neoplastica nella ghiandola mammaria del cane viene ipotizzata come un *continuum* che procede da lesioni iperplastiche verso forme tumorali benigne e quindi maligne (Bender *et al.*, 1984; Gilbertson *et al.*, 1983; Sorenmo *et al.*, 2009). I dati rilevati in questo studio indicano una prevalenza di soggetti portatori di un'unica tipologia morfologica tumorale, più spesso maligna. Quando questa si presenta sottoforma di un singolo nodulo (distribuzione focale), che in generale è risultata l'evenienza più frequente nella popolazione esaminata, non si possono ovviamente valutare eventuali fenomeni di progressione neoplastica, se non nelle forme di carcinoma che sembrano svilupparsi all'interno di tumori benigni (ad es., carcinoma in tumore misto benigno). Quando invece si è osservata un'associazione di tipologie tumorali di tipo diverso nel soggetto, è prevalsa la combinazione di forme tumorali benigne e maligne, evidenza che sembrerebbe avallare l'ipotesi di un passaggio da tumore benigno a maligno. A favore dell'ipotesi del *continuum* della crescita neoplastica mammaria è inoltre l'aver riscontrato che le iperplasie/displasie e l'epiteliosi costituivano fattori di rischio per la presenza di tumori benigni e maligni. L'ipotesi necessita tuttavia di ulteriori approfondimenti, ad esempio uno studio specifico sulle lesioni

multiple dello stesso tipo istologico (multifocali) che varrebbe la pena confrontare ad esempio in termini di grado di malignità e di diametro

Una delle principali problematiche nella formulazione della diagnosi istopatologica in caso di tumore mammario nella specie canina è la mancanza di linee guida precise e ufficialmente riconosciute per la distinzione tra forme neoplastiche benigne e maligne. Uno degli obiettivi di questo lavoro è stato quindi quello di provare a fissare e adottare in maniera rigorosa criteri istologici per differenziare i tumori benigni da quelli maligni. In particolare, è stato a nostro avviso importante stabilire un *cut-off* mitotico al fine di evitare eccessive variazioni soggettive nella valutazione dei casi *borderline* e standardizzare i dati quanto più possibile. Il fatto di non aver registrato metastasi o recidive o decessi per tumore mammario nel gruppo di soggetti con neoplasia benigna, indica come poco probabile in questo lavoro una sottostima di malignità. Eventualmente, la valutazione morfologica e in particolare il *cut-off* mitotico stabilito pari a 3 mitosi su 10 campi a 40X potrebbe aver determinato una sovrastima dei tumori maligni di grado I. Si potrebbe pertanto considerare di procedere con un aumento progressivo di tale *cut-off* associando adeguati studi prognostici.

Al fine di valutare il ruolo del *grading* istologico, sono stati impiegati due diversi sistemi presenti in letteratura per suddividere i carcinomi mammari in grado I, II e III. In questo studio i due sistemi sono stati messi a confronto. Entrambi si sono rivelati significativi nella predizione della tendenza delle neoplasie ad invadere il sistema linfatico. Tuttavia, una maggior efficienza predittiva è stata riconosciuta al sistema proposto da Clemente e collaboratori che, basandosi su una valutazione dell'attività mitotica e della percentuale di formazione di tubuli più rigorosa, era maggiormente in grado di discriminare tra tumori con diversa tendenza ad invadere il sistema linfatico (Clemente *et al.*, 2010).

In particolare il grado III, così come definito da Clemente e collaboratori, si è dimostrato un significativo indicatore prognostico negativo del rischio di sviluppo di metastasi e di decesso dell'animale. La perdita di tale potere prognostico quando considerata la stessa invasione del sistema linfatico nel modello statistico, ha suggerito che il principale motivo dell'associazione tra grado III e prognosi sfavorevole fosse proprio l'elevata tendenza di questi tumori ad invadere il sistema linfatico.

La maggior parte dei tumori maligni in questo lavoro sono stati classificati come grado I e hanno presentato frequenze relativamente basse (attorno al 20%) di invasione dei vasi linfatici, di formazione di metastasi a distanza e di decesso del soggetto nel primo anno dopo la diagnosi. L'invasione linfatica, la metastatizzazione e i decessi erano invece più frequenti per i tumori di grado II. Le differenze in termini di *follow-up* tra tumori di grado I e di grado II non sono risultate però statisticamente significative. In medicina umana risulta difficile associare ai tumori mammari di grado II un comportamento biologico specifico, nettamente distinguibile da quello dei tumori appartenenti alle altre due classi di malignità. Per questa ragione spesso vengono impiegati strumenti diagnostici aggiuntivi, come ad esempio la valutazione del *marker* proliferativo Ki-67, per una predizione più affidabile e precisa dell'andamento della patologia (Aleskandarany *et al.*, 2010). Si ritengono necessari ulteriori studi prognostici per chiarire il comportamento biologico dei tumori di grado II nella specie canina e per decidere se, eventualmente, valga la pena associare alla stima del *grading* la valutazione di altri indici di malignità.

I tumori analizzati in questo lavoro sono stati distinti, sulla base di precisi criteri morfologici, in diversi sottotipi tumorali. Alcuni sottotipi descritti nella classificazione non sono mai stati rinvenuti nella popolazione esaminata per cui sembrerebbero essere molto rari

(carcinoma mucinoso, carcinoma squamoso a cellule fusate, carcinoma variante a cellule fusate, carcinoma cribriforme, fibroadenoma).

La maggior parte delle lesioni neoplastiche benigne diagnosticate in questo lavoro sono state incluse in 3 categorie tumorali note (adenoma complesso, adenoma semplice e tumore misto benigno). I 2 sottotipi tumorali benigni di nuova introduzione nella classificazione (adenoma papillare intraduttale e mioepitelioma) sono apparsi molto rari. Il quadro è invece risultato decisamente più eterogeneo per quanto riguarda le lesioni maligne. Anche in questo caso i tumori maligni rivelatisi più frequenti appartenevano a 5 classi morfologiche già descritte nella classificazione WHO (carcinoma complesso, carcinoma semplice tubulare, carcinoma in tumore misto benigno, carcinoma semplice solido e carcinoma semplice tubulo-papillare), tuttavia il 26.7% di essi si sono distribuiti abbastanza uniformemente in altre 17 categorie tumorali, di cui 6 nuove (carcinoma papillare intraduttale, carcinoma e mioepitelioma maligno, carcinoma comedonico, carcinoma duttale, carcinoma micropapillare invasivo). Questo conferma come il tumore mammario del cane sia caratterizzato, soprattutto nelle forme maligne, da aspetti morfologici molto variegati. La distinzione tra le diverse forme morfologiche assume rilevanza clinica, infatti, in questo studio si è osservato che alcune di esse sembrano associate a comportamenti biologici specifici.

Innanzitutto si è osservato per il carcinoma in tumore misto benigno un comportamento poco aggressivo, simile a quello del carcinoma complesso, potenzialmente a causa di un effetto protettivo svolto dal mioepitelio. Anche i soggetti con carcinoma duttale o con carcinoma papillare intraduttale hanno mostrato un tasso elevato di sopravvivenza.

Al contrario le due forme in assoluto più aggressive sono apparse essere il carcinosarcoma e il carcinoma anaplastico. Questi sono i due tumori che più rapidamente hanno causato il decesso degli animali. Nel caso del carcinoma anaplastico, questo si verifica probabilmente a causa della crescita altamente infiltrante e dell'elevato tasso di invasione del

sistema linfatico. L'elevato rischio di decesso associato al carcinosarcoma era invece indipendente dalla presenza o meno di invasione linfatica. Delle due componenti cellulari che costituiscono questa forma neoplastica, quella sarcomatosa sembrava essere la più aggressiva con un indice proliferativo più elevato (valori elevati di conta mitotica e di espressione di Ki-67).

Si sono registrati numerosi decessi anche nei cani portatori di carcinoma semplice solido e di carcinoma comedonico, ma con un decorso clinico meno rapido rispetto alle due forme tumorali precedenti. Questi due tumori hanno mostrato una spiccata tendenza ad invadere i vasi linfatici e a metastatizzare al linfonodo regionale. Tale comportamento era già stato segnalato in letteratura per il carcinoma semplice solido (Misdorp, 2002). Viene invece qui per la prima volta evidenziato per il carcinoma comedonico che si dimostra nel cane come forma altamente infiltrante, diversa dalla variante “*comedo*” di carcinoma *in situ* descritta nella donna. Le analisi di sopravvivenza e del rischio di sviluppo di metastasi a distanza hanno permesso solo di sospettare un valore prognostico indipendente negativo associato al carcinoma semplice solido e al carcinoma comedonico, probabilmente a causa di una non adeguata numerosità dei casi esaminati. Si rendono necessari ulteriori studi per indagare più dettagliatamente e quantificare il rischio di morte associato a questi due tumori.

Anche per altre forme tumorali come il carcinoma adenosquamoso, il carcinoma micropapillare invasivo e il carcinoma con cellule ricche in lipidi sarebbe opportuno incrementare la numerosità dei campioni a fini prognostici. Si tratta tuttavia di forme molto rare. I risultati ottenuti confermano in ogni caso l'elevata frequenza di invasione linfatica già descritta in letteratura per questi tumori (Cassali *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2003; Gama *et al.*, 2008b).

In questo lavoro i carcinomi semplici tubulari ed i carcinomi semplici tubulo-papillari sono stati considerati, a differenza di quanto indicato nella classificazione WHO, come due

entità morfologiche distinte. Si sono evidenziate tra i due anche differenze in termini di comportamento sia nello studio prognostico A sia nello studio prognostico B: i carcinomi semplici tubulo-papillari hanno presentato un comportamento tendenzialmente più aggressivo. Tuttavia, allo stato attuale risulta difficile trarre conclusioni definitive di tipo prognostico per i soggetti portatori di queste forme tumorali. Infatti, mentre nello studio prognostico A questi tumori non apparivano come forme particolarmente aggressive, nello studio prognostico B entrambi hanno mostrato frequenze abbastanza alte di invasione del sistema linfatico. Tale incongruenza potrebbe essere dovuta ad un comportamento effettivamente molto variabile di queste forme tumorali oppure potrebbe dipendere dalle diverse modalità con cui i campioni sono stati selezionati per i due studi.

Questo lavoro di dottorato ha inoltre permesso di mettere in evidenza una nuova tipologia tumorale, ossia il carcinoma e mioepitelioma maligno, che è stata studiata in maniera approfondita mediante indagini immunoistochimiche. Si tratta di una lesione composta da una popolazione epiteliale luminale (carcinoma) associata ad una popolazione interstiziale mioepiteliale maligna (mioepitelioma maligno). Questo tumore può assumere aspetti morfologici diversi e l'esame immunoistochimico per i marcatori di differenziazione cellulare si è rivelato particolarmente utile per differenziarlo da altre forme, come il carcinoma semplice solido e il carcinosarcoma.

Va inoltre distinto dal carcinoma complesso, caratterizzato anch'esso dalla presenza di una componente mioepiteliale, di aspetto però meno atipico. Questa distinzione è particolarmente importante se si considera che il carcinoma e mioepitelioma maligno ha mostrato, rispetto al carcinoma complesso, una propensione significativamente maggiore ad invadere il sistema linfatico e a metastatizzare a distanza. La componente mioepiteliale di questi 2 tumori ha presentato non solo differenze in termini di atipia cellulare, ma anche di attività proliferativa e

di grado di differenziazione. Il mioepitelio dei carcinomi e mioepiteliomi maligni, infatti, ha mostrato valori più elevati alla conta mitotica e alla valutazione dell'espressione di Ki-67. Le considerazioni sul grado di differenziazione del mioepitelio in queste due tipologie tumorali sono derivate dalla valutazione dei profili di espressione dei marcatori di differenziazione cellulare, interpretati alla luce del confronto con i profili di espressione evidenziati nella ghiandola mammaria sana/iperplastica. Nella ghiandola mammaria sana/iperplastica si sono identificati nel compartimento basale/mioepiteliale, classicamente considerato composto da un'unica popolazione di cellule mioepiteliali, 3 diversi pool cellulari con distinti profili di espressione. Se si ipotizza, come viene fatto per la ghiandola mammaria umana, un modello gerarchico di differenziazione cellulare, questi 3 pool potrebbero rappresentare elementi mioepiteliali a diversi gradi di differenziazione: cellule mioepiteliali scarsamente differenziate o progenitrici (+ per CK5, CK14, p63, VIM), cellule mioepiteliali intermedie (+ per CK5, CK14, p63, SMA, CALP, VIM) e cellule mioepiteliali differenziate (+ per SMA, CALP, VIM). Il mioepitelio dei carcinomi e mioepiteliomi maligni sembra avere un profilo di espressione simile a quello delle cellule mioepiteliali intermedie e progenitrici della ghiandola. La rara debole positività di tali elementi anche per CK8/18, evidenziata occasionalmente anche nei mioepiteliomi maligni della donna, potrebbe riflettere proprio un fenotipo non ancora del tutto differenziato e quindi non del tutto specifico per la linea mioepiteliale (Hungermann *et al.*, 2005). Il mioepitelio dei carcinomi complessi è caratterizzato invece da un profilo di espressione più simile a quello delle cellule mioepiteliali ben differenziate con aspetti di iniziale differenziazione mesenchimale (+ esclusivamente per VIM) già osservati in precedenza (Espinosa de los Monteros *et al.*, 2002). Questi dati suggeriscono che la componente mioepiteliale nei tumori mammari del cane possa in qualche modo avere un ruolo "protettivo", come descritto in letteratura, quando ben differenziata (nei carcinomi complessi), ma che tale funzione non sia preservata quando a

proliferare sono elementi mioepiteliali intermedi o scarsamente differenziati (nei carcinomi e mioepiteliomi maligni). In questo secondo caso gli elementi mioepiteliali sembrerebbero di fatto essere più aggressivi anche della componente carcinomatosa a cui sono associati (maggiore attività proliferativa e più frequente coinvolgimento nella formazione di emboli e metastasi linfonodali). Sempre ipotizzando un modello gerarchico di differenziazione cellulare, anche a livello dello strato luminale della ghiandola si sono identificati sia elementi ghiandolari ben differenziati (+ esclusivamente per CK8/18) che ghiandolari intermedi (+ per CK8/18, CK5 e CK14). Una simile combinazione di fenotipo ghiandolare intermedio e ben differenziato è stata riconosciuta nella componente carcinomatosa di tutti i tumori analizzati, in associazione ad una rara positività luminale per VIM, più marcata nei carcinosarcomi, che potrebbe rappresentare un segno di ridotta differenziazione o di un fenomeno di transizione epitelio-mesenchimale in atto che serve a conferire alle cellule carcinomatose maggior potere migratorio e metastatizzante (Korsching *et al.*, 2005; Sarrio *et al.*, 2008). Infine, nei tumori analizzati la sovraespressione del recettore HER-2 si è dimostrata rara e non significativamente associata a specifici sottotipi tumorali. Rimane quindi dubbio il ruolo di questo recettore nella carcinogenesi mammaria del cane.

In questo lavoro, oltre al sottotipo tumorale e al grado istologico di malignità, si sono indagati anche altri parametri come possibili fattori prognostici indipendenti per i cani affetti da tumori mammari maligni. Tra questi, l'invasione del sistema linfatico che, come atteso, si è dimostrata un indicatore di prognosi sfavorevole con un rischio maggiore di sviluppo di metastasi a distanza e di decesso degli animali. Due caratteristiche morfologiche che hanno mostrato una significativa associazione con l'invasione del sistema linfatico sono state l'infiltrazione delle cellule neoplastiche nello stroma alla periferia del nodulo tumorale e la presenza, anche solo in piccole aree del tumore, di un pattern micropapillare. L'associazione

con l'infiltrazione era già stata dimostrata, associazione dovuta alla maggior facilità per le cellule libere in migrazione nella matrice stromale periferica al tumore di raggiungere i vasi linfatici (Shofer et al., 1989; Hellmèn et al., 1993; Misdorp, 2002). L'associazione col pattern micropapillare è stata invece evidenziata per la prima volta nel cane. Studi in medicina umana riconoscono nell'elevata capacità di crescita ancoraggio-indipendente e di stimolazione dell'angiogenesi delle cellule delle micropapille la ragione della notevole frequenza con cui si diagnostica invasione linfatica in tumori che presentano questo particolare aspetto (Fu *et al.*, 2004; Kamiya *et al.*, 2008).

Il “*vasculogenic mimicry*” non è stato invece significativamente associato all'invasione linfatica ed è stato osservato quasi esclusivamente nei carcinomi anaplastici. La scarsa differenziazione delle cellule neoplastiche potrebbe essere un requisito fondamentale per la formazione di questi piccoli canali microvascolari intracellulari, tuttavia il significato funzionale di questo aspetto morfologico necessita di ulteriori studi per essere svelato.

E' stato inoltre indagato il diametro dei tumori, classicamente considerato nel cane uno degli indicatori prognostici più significativi. Per quanto si sia confermato che mediamente i tumori maligni sono più grandi dei benigni, andando ad indagare i vari sottotipi tumorali sono emersi dettagli in più che permettono di spiegare una quota maggiore della grande variabilità del diametro dei tumori mammari del cane. I tumori con diametro mediamente maggiore erano i carcinomi anaplastici, i sarcomi/carcinosarcomi ed i carcinomi misti. Questo è presumibilmente dovuto, nel caso del carcinoma anaplastico, alla crescita infiltrante ed espansiva delle cellule neoplastiche e alla reazione scirroso che ad esse spesso si associa, mentre nel caso delle altre forme tumorali alla componente mesenchimale che, quando presente, indipendentemente dal fatto che sia benigna o maligna, è generalmente molto estesa. I tumori mediamente più piccoli erano invece il carcinoma *in situ*, proprio per la

sua caratteristica che lo vede circoscritto all'interno di un lobulo ghiandolare e l'adenoma semplice.

In questo lavoro la valenza prognostica del diametro tumorale è stata confermata, in particolare in relazione al rischio di morte dell'animale. Il diametro non è risultato tuttavia un indicatore prognostico indipendente per l'insorgenza di metastasi a distanza. Non si può quindi escludere che l'effetto negativo dei diametri elevati sulla sopravvivenza possa essere dovuto non tanto o non solo ad un tasso metastatico maggiore di queste neoplasie, ma anche all'insorgenza di possibili complicanze in seguito all'intervento chirurgico che generalmente è molto aggressivo per masse di ampie dimensioni.

L'estensione del processo neoplastico ai margini di escissione si è dimostrata associata ad un rischio maggiore di decesso dell'animale nel primo anno dopo l'intervento chirurgico, ma non era un fattore prognostico indipendente per il rischio di morte per tumore e per il rischio di sviluppo di recidive o di metastasi. La contraddittorietà di questi risultati potrebbe essere dovuta al fatto che non sono stati presi in considerazione, come possibili variabili influenti sul *follow-up* del soggetto, alcuni aspetti potenzialmente rilevanti quali la distanza in millimetri della neoplasia dal margine (in caso di margini puliti) e l'eventuale ripetizione dopo il primo intervento chirurgico di un successivo intervento per la rimozione delle cellule neoplastiche residue (in caso di margini interessati).

Per quanto riguarda l'attività mitotica, questa è stata utilizzata per la determinazione del grado di malignità. Si sono anche messe in evidenza differenze significative di attività mitotica in funzione del sottotipo tumorale e della specifica popolazione tumorale. I valori maggiori si sono riscontrati a carico proprio di quei tumori che hanno manifestato un comportamento biologico più aggressivo (carcinosarcoma, carcinoma comedonico, carcinoma

semplice solido, carcinoma anaplastico e carcinoma e mioepitelioma maligno). Come già era stato notato, l'attività mitotica sembra non avere però un valore prognostico indipendente (Misdorp, 2002).

In conclusione con questo lavoro di dottorato si sono definiti criteri morfologici standardizzati per la valutazione istopatologica delle lesioni tumorali della mammella del cane confermando e caratterizzando dettagliatamente classi morfologiche note e individuandone di nuove. Inoltre, si sono messi in risalto alcuni nuovi aspetti relativi all'epidemiologia di questa forma tumorale. Tra questi, la presenza di razze meno a rischio di sviluppo di tumori maligni e la tendenza per gli animali sterilizzati a presentare forme tumorali leggermente diverse, apparentemente più aggressive. È stata inoltre dimostrata o in altri casi confermata con evidenziazione di nuovi dettagli, la valenza prognostica di alcuni parametri quali il diametro tumorale, l'invasione del sistema linfatico, il grado istologico di malignità, il sottotipo tumorale, l'infiltrazione periferica e la presenza di pattern micropapillare.

BIBLIOGRAFIA

Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF et al: Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* 203:661–671, 2004.

Aleskandarany MA, Rakha EA, Macmillan RD, Powe DG, Ellis IO, Green AR: MIB1/Ki-67 labelling index can classify grade 2 breast cancer into two clinically distinct subgroups. *Breast Cancer Res Treat* [pubblicato on-line, 2010].

Andrade FH, Figueiroa FC, Bersano PR, Bissacot DZ, Rocha NS: Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagn Pathol* 5:45, 2010.

Apostolou J, Sarli G, Capitani O, Marcato PS: Considerazioni prognostiche su lesioni pre-neoplastiche e neoplastiche multiple della ghiandola mammaria del cane e del gatto, *Veterinaria* n.4, 1998.

Bánkfalvi A, Ludwig A, De-Hesselle B, Buerger H, Buchwalow IB, Boecker W: Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. *Mod Pathol* 17:1051-61, 2004.

Beadle BM, Woodward WA, Buchholz TA: The impact of age on outcome in early-stage breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 21:26-34, 2011.

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

Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ: Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Vet Pathol* 36:423–436, 1999.

Bertagnolli AC, Cassali GD, Genelhu MC, Costa FA, Oliveira JF, Gonçalves PB: Immunohistochemical expression of p63 and deltaNp63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. *Vet Pathol* 46:407–415, 2009.

Böcker W, Moll R, Poremba C, Holland R, Van Diest PJ, Dervan P, et al: Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest* 82:737-46, 2002.

Boecker W, Buerger H: Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif* 1:73-84, 2003.

Bostock DE: The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *Eur J Cancer* 11:389-96, 1975.

Brodey RS, Fidler IJ, Howson AE: The relationship of estrus cycle irregularity, pseudo-pregnancy, and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. *J Am Animal Hosp Assoc* 149:1047–1049, 1966.

Brønden LB, Nielsen SS, Toft N, Kristensen AT: Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Vet Rec* 166:586-90, 2010.

Brunetti B, Sarli G, Marcato PS, Benazzi C: Histochemical and immunohistochemical characterization of canine mammary mucinous carcinoma. *J Comp Pathol* 129:131-6, 2003.

Carter WB, Niu G: Human epidermal growth factor receptor 2 regulates angiopoietin-2 expression in breast cancer via AKT and mitogen-activated protein kinase pathways. *Cancer Res* 67:1487-93, 2007.

Casalini P, Iorio MV: ERBB2 (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)), Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, 2004, URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/ERBB2ID162ch17q11.html>.

Cassali GD, Serakides R, Gartner F, Schmitt FC: Invasive micropapillary carcinoma of the dog mammary gland: a case report. *Arq Bras Med Vet Zootec* 54:366-369, 2002.

Castagnaro M, Casalone C, Bozzetta E, De Maria R, Biolatti R, Caramelli M: Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci* 65: 223-226, 1998.

Chandra SA, Mark Cline J, Adler RR: Cyclic morphological changes in the beagle mammary gland. *Toxicol Pathol* 38:969-83, 2010.

Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML: Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998–2002). *J Am Vet Med Assoc* 227:1625–1629, 2005.

Cleary P, Grossmann M: Minireview: Obesity and Breast Cancer: The Estrogen Connection. *Endocrinology* 150:2537-42, 2009.

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

Clemons M, Goss P: Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 344:276-85, 2001.

Cocola C, Anastasi P, Astigiano S, Piscitelli E, Pelucchi P, Vilardo L, et al: Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumour-initiating potential. *Reprod Domest Anim* 2:214-7, 2009.

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

Concannon PW, Spraker TR, Casey HW, Hansel W: Gross and histopathologic effects of medroxyprogesterone acetate and progesterone on the mammary gland of adult beagle bitches. *Fertil Steril* 36:373–387, 1981.

Contesso G, Mouriesse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J: The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol* 5:1378-86, 1987.

Coppock HA, Clarke RB: Mammary stem cells: the root of breast cancer? *Breast Cancer Online* 7(9), 2004.

Dabbs D: *Diagnostic Immunohistochemistry*, seconda edizione, 2006.

Dellman HD e Eurell JA: *Istologia e Anatomia Microscopica Veterinaria*, seconda edizione, 2000.

Destexhe E, Lespagnard L, Degeyter M, Heymann R, Coignoul F: Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 30:146–154, 1993.

Dobson MJ, Morris J, *Small Animal Oncology*, terza edizione, 2001.

Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR: Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California, II: cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst* 40:307–318, 1968.

Draeger A, Gimona M, Stuckert A, Celis JE, Small JV: Calponin. Developmental isoforms and a low molecular weight variant. *FEBS Lett* 291:24-8, 1991.

Engenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Heuler H: Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med* 69:109-127, 2005.

Espinosa de los Monteros A, Millan MY, Ordas J, Carrasco L, Reymundo C, Martín de las Mulas: Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. *Vet Path* 39:247–256, 2002

FCI (Federazione Cinofila Internazionale, 2008) indirizzo homepage: <http://www.fci.be>

Foidart JM, Colin C, Denoo X, Desreux J, Beliard A, Fournier S, et al: Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells. *Fertil Steril* 69: 963-969, 1998.

Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ: Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 156:361-81, 2000.

Fowler EH, Wilson GP, Koestner A: Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. *Vet Pathol* 11:212-229, 1974.

Fu L, Ikuo M, Fu XY, Liu TH, Shinichi T: Relationship between biologic behavior and morphologic features of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 33:21-5, 2004.

Gama A, Alves A, Gartner F, Schmitt F: p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Vet Pathol* 40:412-420, 2003.

Gama A, Alves A, Schmitt F: Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch* 453:123-32, 2008a.

Gama A, Alves A, Schmitt FC: Clinicopathologic features of mammary invasive micropapillary carcinoma (IMC) in dogs. *Vet Pathol.* 45:600-1, 2008b.

Gärtner F, Geraldés M, Cassali G, Rema A, Schmitt F: DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumours: putative evidence for a common histogenesis. *Vet J* 158:39–47, 1999.

Geil RG, Lamar JK: FDA studies of estrogen, progesterons, and estrogen/progesterone combinations in the dog and monkey. *J Tox Envir Health* 3:179–193, 1977.

Ghafoor A, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Thun M: Trends in Breast Cancer by Race and Ethnicity. *CA Cancer J Clin* 53:342, 2003.

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

Giles RC, Kwapien RP, Geil RG, Casey HW: Mammary nodules in beagle dogs administered investigational oral contraceptive steroids. *J Natl Cancer Inst* 60:1351–1364, 1978.

Gollamudi SV, Gelman RS, Peiro G, Schneider LJ, Schnitt SJ, Recht A, et al: Breast-conserving therapy for stage I-II synchronous bilateral breast carcinoma. *Cancer* 79:1362-9, 1997.

Gregoraszczyk EL, Milewicz T, Kolodziejczyk J, Krzysiek J, Basta A, Sztefko K, et al: Progesterone-induced secretion of growth hormone, insulin-like growth factor I and prolactin by human breast cancer explants. *Gynecol Endocrinol* 15:251-8, 2001.

Griffey SM, Madewell BR, Dairkee SH, Hunt JE, Naydan DK, Higgins RJ: Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. *Vet Pathol* 30:155–161, 1993.

Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK: *Skin diseases of the dog and cat, clinical and histopathologic diagnosis, seconda edizione*, 2005.

Gunnell D, Okasha M, Smith GD, Oliver SE, Sandhu J, Holly JM: Height, leg length, and cancer risk: a systematic review. *Epidemiol Rev* 23:313-42, 2001.

Hellmèn E, Bergstrom R, Holmberg L: Prognostic factors in canine mammary gland tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol* 30:20–27, 1993.

Hsu WL, Huang HM, Liao JW, Wong ML, Chang SC: Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Vet J* 180:116-23, 2007.

Hungermann D, Buerger H, Oehlschlegel C, Herbst H, Boecker W: Adenomyoepithelial tumours and myoepithelial carcinomas of the breast--a spectrum of monophasic and biphasic tumours dominated by immature myoepithelial cells. *BMC Cancer* 5:92, 2005.

Hunter DJ, Colditz GA, Hankinson SE, Malspeis S, Spiegelman D, Chen W, et al: Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19:2496-502, 2010.

Itoh T, Uchida K, Ishikawa K, Kushima K, Kushima E, Tamada H, et al: Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci* 67:345-7, 2005.

Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP, Kotliansky VE: Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci* 90:999-1003, 1993.

Jevtic M, Velicki R, Popovic M, Cemerlic-Adjic N, Babovic SS, Velicki L: Dietary influence on breast cancer. *J BUON* 15:455-61, 2010.

Joslyn SA: Racial differences in treatment and survival from early-stage breast carcinoma. *Cancer* 95:1759-66, 2002.

Kaaks R, Berrino F, Key T, Rinaldi S, Dossus L, Biessy C et al: Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl. Cancer Instit* 97:755-765, 2005.

Kamiya K, Hayashi Y, Douguchi J, et al: Histopathological features and prognostic significance of the micropapillary pattern in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol* 21:992-1001, 2008.

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

Kawabata A, Okano K, Uchida K, Yamaguchi R, Hayashi T, Tateyama S: Co-localization of chondromodulin-I (ChM-I) and bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells of canine mammary tumors. *J Vet Med Sci* 67:1097–1102, 2005.

Kim IY, Yong HY, Kang KW, Moon A: Overexpression of ErbB2 induces invasion of MCF10A human breast epithelial cells via MMP-9. *Cancer Letters* 275:227-33, 2009.

Kim JH, Im KS, Kim NH, Yhee JY, Nho WG, Sur JH: Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: Histopathological and immunohistochemical study. *Vet J* [pubblicato on-line, 2010].

Klopfleisch R, Gruber AD: Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. *Vet Pathol* [pubblicato on-line, 2010].

Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wülfing P, van Diest PJ, Brandt B, Boecker W, Buerger H: The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelialmesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol* 206:451-457, 2005.

Kurzman ID, Gilbertson SR: Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg* 1:25–32, 1986.

Kwapien RP, Giles RC, Geil RG, Casey HW: Malignant mammary tumors in beagle dogs dosed with investigational oral contraceptives. *J Natl Cancer Inst* 65:137–144, 1980.

Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY, Kweon OK: Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J Vet Sci* 5:63-9, 2004.

Leong TY, Leong AS: Controversies in the assessment of HER-2: more questions than answers. *13:263-9*, 2006.

Lynch MD, Cariati M, Purushotham AD: Breast cancer, stem cells and prospects for therapy. *Breast Cancer Res* 8:211, 2006.

Luini A, Rososchansky J, Gatti G, Zurrada S, Caldarella P, Viale G, et al: The surgical margin status after breast-conserving surgery: discussion of an open issue. *Breast Cancer Res Treat.* 113:397-402, 2009.

Lundin J, Lundin M, Holli K, Kataja V, Elomaa L, Pylkkänen L, et al: Omission of histologic grading from clinical decision making may result in overuse of adjuvant therapies in breast cancer: results from a nationwide study. *J Clin Oncol* 19:28-36, 2001.

Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, et al: Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 346:2025-32, 2002.

Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, et al: Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med* 22:976-84, 2008.

Metcalfe K, Lubinski J, Lynch HT, Ghadirian P, Foulkes WD, Kim-Sing C, et al: Family History of Cancer and Cancer Risks in Women with BRCA1 or BRCA2 Mutations. *J Natl Cancer Inst* [pubblicato on-line, 2010].

Mieog JS, van de Velde CJ: Neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Expert Opin Pharmacother* 10:1423-34, 2009.

Misdorp W, Hart AA: Prognostic factors in canine mammary cancer. *J Natl Cancer Inst* 56:779-86, 1976.

Misdorp W: Canine mammary gland tumors: Protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet Q* 10:26–33, 1988.

Misdorp W, Else RW, Hellmèn E, Lipscomb TP: Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat, 2nd series, vol. 7. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1999.

Misdorp W: Tumors of the Mammary Gland. In: *Tumors in Domestic Animals*, ed. Meuten DJ, Iowa State Press, Ames, Iowa, 2002.

Mitchell L, de la Iglesia FA, Wenkoff MS: Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. *Can Vet J* 15:131–138, 1974.

Moe L: Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl* 57:439–443, 2001.

Mol JA, Lantinga-van Leeuwen IS, van Garderen E, Selman PJ, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Schalken JA, et al: Mammary growth hormone and tumorigenesis--lessons from the dog. *Vet Q* 21:111-5, 1999.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24, 1982.

Molyneux G, Regan J, Smalley MJ: Mammary stem cells and breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 64:3248-60, 2007.

Monlux AW, Roszel JF, MacVean DW, Palmer TW: Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. *Vet Pathol* 14:194-217, 1977.

Morris JS, Dobson JM, Bostock DE, O'Farrell E: Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. *Vet Rec* 142:656-8, 1998.

Moulton JE, Rosenblatt LS, Goldman M: Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Vet Pathol* 23:741-749, 1986.

Mouser P, Miller MA, Antuofermo E, Badve SS, Mohammed SI: Prevalence and classification of spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs without clinical mammary disease. *Vet Pathol* 47:275-84, 2010.

Nassar H: Carcinomas with micropapillary morphology: clinical significance and current concepts. *Adv Anat Pathol* 11:297-303, 2004.

Neumeister V, Agarwal S, Bordeaux J, Camp RL, Rimm DL: In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis. *Am J Pathol* 176:2131-8, 2010.

Orfanou DC, Pourlis A, Ververidis HN, Mavrogianni VS, Taitzoglou IA, Boscios CM, et al: Histological Features in the Mammary Glands of Female Dogs throughout Lactation. *Anat Histol Embryol* [pubblicato on-line, 2010].

Otoni CC, Rahal SC, Vulcano LC, Ribeiro SM, Hette K, Giordano T: Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. *Acta Vet Scand* 52:20, 2010.

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

Panet-Raymond V, Truong PT, Alexander C, Lesperance M, McDonald RE, Watson PH: Clinicopathologic factors of the recurrent tumor predict outcome in patients with ipsilateral breast tumor recurrence. *Cancer* [pubblicato on-line, 2010].

Park YH, Jung HH, Ahn JS, Im YH : Ets-1 upregulates HER2-induced MMP-1 expression in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377:389-94, 2008.

Patsikas MN, Dessiris A: The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: The 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. *Anat Histo Embryol* 25:131–138, 1996.

Patsikas MN, Dessiris A: The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study, part II: the 3rd mammary gland. *Anat Histo Embryol* 25:139–143, 1996.

Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidoy E, Papazoglou LG, Papadopoulou PL, Tzegas SI, et al: The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histo Embryol* 35:228–234, 2006.

Peña L, Perez-Alenza MD, Rodriguez-Bertos A, Nieto A: Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat* 78:141-8, 2003.

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

Perez Alenza MD, Peña L, del Castillo N, Nieto AI: Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Animal Pract* 41:287-91, 2000.

Philibert JC, Snyder PW, Glickman N, Glickman L, Knapp D, Waters D: Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Intern Med* 17:102–106, 2003.

Polyak K, Hu M: Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:231-247, 2005.

Press DJ, Sullivan-Halley J, Ursin G, Deapen D, McDonald JA, Strom BL, et al: Breast Cancer Risk and Ovariectomy, Hysterectomy, and Tubal Sterilization in the Women's Contraceptive and Reproductive Experiences Study. *Am J Epidemiol* [publicato on-line, 2010].

Priester WA, Mantel N: Occurrence of tumors in domestic animals: data from 12 United States and Canadian Colleges of Veterinary Medicine. *J Natl Cancer Inst* 47:1333–1344, 1971.

Pruthi S, Gostout BS, Lindor NM: Identification and Management of Women With BRCA Mutations or Hereditary Predisposition for Breast and Ovarian Cancer. *Mayo Clin Proc* 85:1111-20, 2010.

Queiroga FL, Pérez-Alenza MD, Silvan G, Peña L, Lopes CS, Illera JC: Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumours. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110:76-82, 2008.

Ramalho LN, Ribeiro-Silva A, Cassali GD, Zucoloto S: The expression of p63 and cytokeratin 5 in mixed tumors of the canine mammary gland provides new insights into the histogenesis of these neoplasms. *Vet Pathol* 43:424–429, 2006.

Rehm S, Stanislaus DJ, Williams AM: Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80:233–245, 2007.

Reis-Filho JS, Tutt AN: Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 52:108–118, 2008.

Ressel L, Millanta F, Caleri E, Innocenti VM, Poli A: Reduced PTEN protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumors. *Vet Pathol* 46:860-8, 2009.

Richards HG, McNeil PE, Thompson H, Reid SWJ: An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. *Prev Vet Med* 51:125–136, 2001.

Rivadeneira DE, Simmons RM, Christos PJ, Hanna K, Daly JM, Osborne MP: Predictive factors associated with axillary lymph node metastases in T1a and T1b breast carcinomas: analysis in more than 900 patients. *J Am Coll Surg* 191:1-6, 2000.

Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, et al: Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res* 69:8770-4, 2009.

Robbins SL, Cotran RS: *Basic Pathology*, ottava edizione, 2010.

Rodo A, Malicka E: Immunohistochemical expression of protein p53 in neoplasms of the mammary gland in bitches. *Pol J Vet Sci* 11:89-95, 2008.

Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG: Tumors of the mammary gland. In: Small Animal Clinical Oncology, ed. SJ Withrow, AQ3 EG MacEwen, 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia, PA, 2001 .

Santen R, Cavalieri E, Rogan E, Russo J, Guttenplan J, Ingle J, et al: Estrogen mediation of breast tumor formation involves estrogen receptor-dependent, as well as independent, genotoxic effects. *Ann N Y Acad Sci* 1155:132-40, 2009.

Santos M, Marcos R, Faustino AM: Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle *Reprod Domest Anim* [pubblicato on-line, 2009].

Sarrió D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J: Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 68:989–997, 2008.

Schafer KA, Kelly G, Schrader R, Griffith WC, Muggenburg BA, Tierney LA, et al: A canine model of familial mammary gland neoplasia. *Vet Pathol* 35:168–177, 1998.

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

Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, van Garderen E, Rijnberk A: Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology* 134:287-92, 1994.

Selvarajan S, Bay BH, Chng MJ, Tan PH: The HercepTest and routine C-erbB2 immunohistochemistry in breast cancer: any difference? *Ann Acad Med Singapore* 33:473-6, 2004.

Shofer FS, Sonnenschein EG, Goldschmidt MH, Laster LL, Glickman LT: Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 13:49–60,1989.

Sigal-Zafrani B, Lewis JS, Clough KB, Vincent-Salomon A, Fourquet A, Meunier M, et al: Histological margin assessment for breast ductal carcinoma in situ: precision and implications. *Mod Pathol* 17:81-8, 2004.

Smalley M, Ashworth A: Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer* 3:832-44, 2003.

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

Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH: Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J Vet Intern Med* 14:266-70, 2000.

Sorenmo K: Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33:573-96, 2003.

Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Langeland M, et al: Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol* 7:162-72, 2009.

Stovring M, Moe L, Glattre E: A population based case-control study of canine mammary tumors and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *APMIS* 105:590–596, 1997.

Tateyama S, Uchida K, Hidaka T, Hirao M, Yamaguchi R: Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors. *Vet Path* 38:703–709, 2001.

Taylor GN, Shabestari L, Williams J, Mays CW, Angus W, McFarland S: Mammary neoplasia in a closed Beagle colony. *Cancer Research* 36:2740–2743, 1976.

Terashima I, Suzuki N, Shibutani S: Mutagenic properties of estrogen quinone-derived DNA adducts in simian kidney cells. *Biochemistry* 40:166-72, 2001.

Thijssen JH: On the possible role of mammary-derived growth hormone in human breast cancer. *Maturitas* 1:S13-6, 2009.

Utada Y, Kasumi F, Yoshimoto M, Tada T, Saitoh M, Takahashi K, Akiyama F, Sakamoto G, Nishi M: The location of positive nodes partly influences the prognostic value of the number of positive nodes in breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 29:63-7, 1999.

Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, et al: Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* 10:135, 2009.

Ueng SH, Mezzetti T, Tavassoli FA: Papillary neoplasms of the breast: a review. *Arch Pathol Lab Med* 133:893-907, 2009.

Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M: Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol* 23:7212-20, 2005.

Vos JH, van den Ingh TS, Misdorp W, Molenbeek RF, van Mil FN, Rutteman GR, Ivanyi D, Ramaekers FC: Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and alpha-smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: benign mammary tumours and duct ectasias. *Vet Q* 15:89–95, 1993.

Wennbo H, Törnell J: The role of prolactin and growth hormone in breast cancer. *Oncogene* 19:1072-6, 2000.

Wiebe PH: Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 13:717-738, 2006.

Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K: Prognosis for canine malignant mammary tumors based on the TNM and histologic classification. *J Vet Med Sci* 58:1079–1083, 1996.

Zhang S, Zhang D, Sun B: Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Lett* 254:157-64, 2007.

Zekioglu O, Erhan Y, Ciris M, Bayramoglu H, Ozdemir N: Invasive micropapillary carcinoma of the breast: high incidence of lymph node metastasis with extranodal extension and its immunohistochemical profile compared with invasive ductal carcinoma. *Histopathology* 44:18-23, 2004.

