



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: SANITA' PUBBLICA E PATOLOGIA COMPARATA

CICLO: XX

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI IMMUNOMARCATORI

NEL TUMORE MAMMARIO FELINO

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Marco Martini

Supervisore: Ch.mo Prof. Massimo Castagnaro

Dottorando: Dr. Diego Caliarì

31 gennaio 2008

RIASSUNTO

L'uso degli animali da compagnia come modello per lo studio del cancro nell'uomo sta portando a chiarire molti aspetti dello sviluppo delle neoplasie e alla scoperta di nuovi approcci terapeutici. L'elevata incidenza, le caratteristiche istopatologiche, alcuni aspetti di tumorigenesi e l'indipendenza dagli estrogeni fanno del tumore mammario felino un buon modello per lo studio dei tumori al seno ormono-indipendenti nella donna. In questo lavoro valutazioni immunohistochimiche sull'espressione di recettori ormonali, dell'oncogene HER-2, dell'oncosoppressore p53, di diversi filamenti citoplasmatici (citocheratine, vimentina, alfa actina della muscolatura liscia), della calponin e del marcatore di proliferazione Ki67 sono state effettuate su lesioni neoplastiche maligne e benigne, lesioni iperplastiche/displastiche e tessuto ghiandolare mammario sano di 81 gatte. I risultati ottenuti sono stati confrontati con gli aspetti morfologici delle neoplasie e con i dati anamnestici e di follow up raccolti. I risultati hanno permesso di effettuare considerazioni di carattere generale sull'individuazione di specifiche categorie tumorali e considerazioni specifiche all'espressione dei singoli marcatori molecolari oggetto di studio. La valutazione dei filamenti citoplasmatici è stata effettuata per tentare di chiarire gli aspetti istogenetici dei tumori mammari felini e per evidenziare l'eventuale presenza della categoria di carcinomi "basal-like" descritti nella donna. L'evidenziazione di specifici profili di espressione delle citocheratine (ck) basali 5/6 e 14, la positiva correlazione statistica evidenziata tra questi due marcatori, e l'alta incidenza dell'espressione della vimentina potrebbero essere indicativi di una origine dei tumori da cellule pluripotenti, da elementi epiteliali basali o da elementi epiteliali localizzati a livello terminale duttale. L'impiego della alfa-actina, della calponina e della ck14 ha inoltre dato la possibilità di riconoscere specificamente una popolazione mioepiteliale che non sempre era evidenziata alle normali indagini istologiche, anche quando caratterizzata da spiccati caratteri di malignità, permettendo quindi una classificazione più precisa della lesione. Per quanto riguarda i singoli marcatori si è evidenziato una scarsa espressione, in contrasto con quanto riportato in letteratura, dell'HER-2, suggerendo che tale gene possa non rivestire un ruolo chiave nella proliferazione neoplastica mammaria felina. L'indice di espressione di Ki-67 ha mostrato una differenza significativa di espressione tra lesioni iperplastiche/neoplastiche, correlando inoltre positivamente con il grading, con la sopravvivenza e con l'espressione di p53, a conferma dei dati della letteratura che descrivono il ki67 come un buon indicatore del comportamento biologico di una popolazione tumorale. Infine, i risultati negativi per l'espressione dei recettori ormonali e la correlazione

negativa con il grading confermano il carattere di aggressività delle neoplasie mammarie feline.

ABSTRACT

The use of companion animals as a cancer model for human oncology is leading to a better understanding of many cancerogenic aspects and to new therapeutic approaches. The high incidence, the histopathology, some tumorigenic aspects and the estrogen-independency, make of the feline mammary carcinoma a suitable model for the study of hormonal-independent breast cancers. In the present work, immunohistochemical evaluations of the expression of hormonal receptors, of the oncogene HER-2, of the oncosuppressor p53, of different cytoplasmic filaments (cytokeratins, vimentin, alpha-smooth muscle actin), of calponin, and of the proliferation marker Ki67 have been performed on feline mammary neoplasia, hyperplastic/dysplastic lesions, and normal mammary gland in 81 queens. The results are compared with the morphological aspects of the tumours and with the anamnestic and the follow-up data. Data obtained have allowed general considerations about neoplastic categories and more specific considerations about the expression of each marker. The cytoplasmic filaments have been investigated to better understand the histogenetic aspects of the feline mammary tumour and to eventually evaluate the presence of a “basal-like” group of cancers as described in women. The expression of basal cytokeratins (cytokeratin 5/6 and 14), that showed a positive correlation, and the high incidence of vimentin expression might suggest a pluripotent cell, a basal cell or a terminal duct as origin of the mammary tumours in the cat. In addition, the analysis of a-sma, calponin, and ck14 showed the presence of a myoepithelial component that was not always detected in routine histological sections, even when highly malignant, allowing in this way a better classification of the lesions. Regarding expression of specific markers, lower expression levels of HER-2 than what described within literature were observed, suggesting that this gene might not play a fundamental role in the feline mammary tumours development. Ki-67 presented a significant difference in expression between neoplastic and hyperplastic lesions, it positively correlated with grading, survival, and p53 expression, confirming its well-known role as indicator of the biological behavior of a neoplastic population. Finally, evidence of a large group of hormone-independent feline mammary tumours confirms a general more aggressive nature of these neoplasia in the feline species.

SOMMARIO

1 INTRODUZIONE

- 1.1 La ghiandola mammaria del gatto: embriogenesi ed anatomia pag 5
- 1.2 Il tumore mammario del gatto: epidemiologia e biologia pag 8
- 1.3 Classificazione e stadiazione dei tumori mammari pag 10
- 1.4 Aspetti prognostici del tumore mammario pag 14
- 1.5 Terapie pag 15
- 1.6 Il tumore mammario del gatto come modello umano pag 17
- 1.7 Cellule epiteliali, cellule mioepiteliali e cellule multipotenti: istogenesi e tumorigenesi pag 19
- 1.8 Tumore mammario e recettori ormonali
- 1.8.1 Struttura, modalità di attivazione e ruolo del recettore degli estrogeni nelle neoplasie mammarie pag 27
- 1.8.2 Struttura, modalità di attivazione e ruolo del recettore del progesterone nelle neoplasie mammarie pag 29
- 1.9 L'oncogene HER-2 e i tumori mammari pag 31
- 1.10 Il p53 nei tumori mammari pag 34
- 1.11 Il Ki67 e i tumori mammari pag 36
- 1.12 "Ritratto" del tumore mammario pag 38

2 SCOPO pag 40

3 MATERIALI E METODI

- 3.1 Tessuti esaminati pag 41
- 3.2 Classificazione delle lesioni e grading pag 41
- 3.3 Indagine immunoistochimica pag 44
- 3.4 Valutazione della positività dei tessuti pag 47
- 3.5 Raccolta informazioni di follow up pag 49
- 3.6 Analisi Statistiche pag 49

4 RISULTATI

4.1	Dati anamnestici	pag 50
4.2	Indagini istologiche	pag 53
4.3	immunoistochimiche	pag 54
4.4	Indagini statistiche	pag 60

5	DISCUSSIONE	pag 64
----------	--------------------	--------

6	BIBLIOGRAFIA	pag 70
----------	---------------------	--------

APPENDICE I (risultati immunoistochimici)

APPENDICE II (fotografie)

1 INTRODUZIONE

1.1 La ghiandola mammaria del gatto: embriogenesi ed anatomia

Il tessuto ghiandolare della mammella origina, a livello embrionale, dall'ectoderma. Le varie fasi della sua morfogenesi sono simili in tutti i mammiferi. Dapprima compaiono due creste ectodermiche parallele, lateralmente alla linea mediana ventrale del feto, le linee del latte, che successivamente perdono la loro continuità e formano, nella gatta, due serie di quattro gruppi di cellule ectodermiche disposti in posizione paramediana a partire dal torace fino all'addome che costituiscono gli abbozzi delle diverse ghiandole mammarie. Ad uno stadio più avanzato le cellule della faccia profonda degli abozzi proliferano formando dei prolungamenti che si spingono nel sottogiacente tessuto connettivo originando, per canalizzazione, il sistema dei dotti lattiferi. Alla nascita la mammella ha una struttura del tutto rudimentale ed è formata dai capezzoli e dai dotti lattiferi. Successivamente l'accrescimento della mammella segue, fino alla pubertà, quello generale corporeo (accrescimento isometrico). Con l'inizio dell'attività ovarica la mammella cresce in misura maggiore del resto del corpo (accrescimento allometrico) in quanto ogni ciclo apporta un lieve aumento della ghiandola. L'accrescimento più evidente si osserva in gravidanza, all'inizio è molto lento, ma successivamente aumenta fino al momento del parto quando l'organo acquista la piena funzionalità.

La mammella nel gatto è composta di 4 complessi mammari per lato, posti ai due lati della linea mediana lungo la parte ventrale dell'addome e del torace, che vengono distinti, per ciascuna fila, in mammella toracica craniale (T1), toracica caudale (T2), addominale craniale (A1) e addominale caudale (A2). Ogni unità mammaria porta un capezzolo cuneiforme, piccolo e a punta appiattita. Le coppie di capezzoli raramente, segmentariamente, sono posti alla stessa altezza ma, al contrario, sono di solito disposti alternativamente cosicchè, in relazione alla disposizione della madre, i gattini possono agevolmente poppare uno accanto all'altro durante l'allattamento. Le piccole mammelle semisferiche della gatta in lattazione sono fittamente rivestite di peli. La cute del capezzolo è bianca o pigmentata a seconda del colore del pelo. L'epidermide possiede leggera rugosità ed è coperta di fini peli nonchè provvista di grosse ghiandole sebacee e sudoripare. Nella mammella "a riposo" i capezzoli sono così piccoli che rimangono completamente nascosti dal pelo. Possono però essere palpati a circa 30 mm dalla linea mediana. Nel periodo della lattazione essi raggiungono una lunghezza di 5-9 mm. Con l'uso di una lente si possono osservare sulla punta del

capezzolo 5-7 osti papillari, dei quali 2-3 sono disposti direttamente sull'apice, mentre i rimanenti sono disposti irregolarmente sui lati fino a metà altezza del capezzolo. Il sistema dei dotti lattiferi non è visibile ad occhio nudo. Al microscopio si può riconoscere che dagli osti papillari si dipartono sottili dotti papillari con le rispettive diramazioni, cisterne del capezzolo, e che con andamento obliquo all'asse del capezzolo si dirigono verso il suo centro e poi, affiancati, decorrono verso la base del capezzolo. In questo punto i dotti divergono, cosicché quelli mediali penetrano nel parenchima mammario dorsalmente, quelli anteriori cranialmente e quelli posteriori caudalmente. Negli animali che non allattano le cisterne mostrano delle alte pieghe longitudinali che scompaiono durante la lattazione. I dotti papillari possono inoltre essere provvisti di peli mammari e ghiandole sebacee e terminare anche a fondo cieco. Il gatto maschio possiede di regola solo due coppie di piccoli capezzoli posti, bilateralmente, sia nella regione ombelicale sia nella regione xifoidea. Alla vascolarizzazione della mammella del gatto partecipano i rami dell'arteria e della vena epigastrica craniale superficiale e caudale superficiale, dell'arteria e della vena toracica laterale e dell'arteria e della vena toracica interna (Nickel *et al.*, 1992). Il drenaggio linfatico può avvenire, per le ghiandole intermedie (T2, A1) caudalmente a livello del centro linfatico inguinale superficiale e, cranialmente, a carico del centro linfonodale ascellare. La ghiandola T1 drena esclusivamente cranialmente mentre A2 esclusivamente caudalmente (Raharison *et al.*, 2005). L'innervazione avviene attraverso il nervo genitofemorale e i nervi intercostali.

La ghiandola mammaria è una ghiandola tubuloalveolare composta costituita da gruppi di adenomeri separati da setti connettivali che formano i lobuli. Ciascun lobulo risulta associato ad un dotto intralobulare che immette in un dotto interlobulare, il quale a sua volta si continua nella cisterna del capezzolo e successivamente, i dotti papillari si aprono negli orifizi papillari sul capezzolo. Nella ghiandola mammaria normale l'epitelio squamoso cheratinizzato che riveste esternamente il capezzolo si introflette per un tratto nei dotti papillari per poi cambiare bruscamente in un epitelio cuboidale bistratificato che riveste il sistema dei dotti lattiferi. I dotti intralobulari e i lobuli sono rivestiti da due tipologie di cellule. Uno strato discontinuo di cellule contrattili che contengono miofilamenti (cellule mioepiteliali) si trova a ridosso della membrana basale. Tali cellule intervengono nella eiezione del latte durante la lattazione e giocano un ruolo importante nel mantenimento della normale struttura e funzione dei lobuli e della membrana basale. Un secondo strato di cellule epiteliali si trova invece a ridosso del lume. Le cellule luminali dei dotti terminali (intralobulari) e dei lobuli producono il latte. Nella donna si suppone che cellule staminali localizzate a livello dei dotti terminali siano responsabili dello sviluppo di entrambe le tipologie

cellulari (cellule lumenali e cellule mioepiteliali). Le cellule lumenali costituiscono un epitelio semplice la cui altezza varia considerevolmente durante le differenti fasi dell'attività secernente. Le cellule secernenti sono batiprismatiche e nella loro porzione basale presentano un reticolo endoplasmatico ruvido molto sviluppato; il nucleo è sferico, centrale, e tutta la porzione apicale del citoplasma contiene gocce lipidiche in stretta relazione topografica con mitocondri oltre a vescicole delimitate da membrana, contenenti micelle proteiche. Col procedere del ciclo secernente, le gocce lipidiche migrano verso la superficie della cellula che si solleva e sporge nel lume dell'alveolo. Le gocce lipidiche vengono liberate dalla cellula avvolte da un sottile strato di citoplasma e rivestite da membrana. Anche le vescicole che contengono le micelle vengono sospinte verso la superficie cellulare e liberano il loro contenuto per esocitosi. Il latte viene pertanto prodotto per secrezione apocrina e merocrina. La continua secrezione del latte fa dilatare il lume dell'alveolo e alveoli adiacenti possono in parte fondersi fra loro. Alla fine del ciclo secernente le cellule dell'alveolo sono cubiche basse. Non tutti i lobuli della ghiandola sono contemporaneamente nella stessa fase secernente; pertanto nella stessa sezione istologica si possono osservare lobuli in differenti stadi del processo di secrezione, mentre nello stesso lobulo tutti gli adenomeri si trovano all'incirca nella stessa fase secernente (Nickel *et al.*, 1992).

1.2 Il tumore mammario del gatto: epidemiologia e biologia

Il tumore mammario è la terza neoplasia più frequentemente diagnosticata nel gatto dopo i linfomi e le neoplasie cutanee (Dorn *et al.*, 1968) e costituisce un sesto di tutte le neoplasie che si evidenziano nella gatta. Costituisce il 12% delle neoplasie maligne del gatto e la percentuale sale al 17% se si considerano le neoplasie in gatti di sesso femminile con un'incidenza annuale di 25,4 gatte colpite su 100.000 (Hayes e Mooney, 1985). Il tumore mammario è stato evidenziato in animali di 1 anno di età ma l'età media di insorgenza è di 10 anni (con un intervallo compreso tra i 4 e i 17 anni) e nel Siamese è stata riscontrata da alcuni autori una predisposizione di razza con un'età media di insorgenza più bassa (tra i 7 e i 9 anni) (Hayes *et al.*, 1981). Le forme maligne vengono riscontrate con una percentuale che va dall'80% al 96% dei casi (Castagnaro *et al.*, 1998). La maggior parte metastatizza rapidamente in diverse sedi iniziando dai linfonodi regionali e successivamente, attraverso il circolo sanguigno e linfatico a vari organi quali polmone, pleura e fegato (Weijer *et al.*, 1972; Stolwijk *et al.*, 1989).

Il tumore può presentarsi con noduli singoli o multipli in una o più ghiandole. La presenza di noduli mammari multipli è riportata in letteratura con una frequenza variabile dal 7% (Weijer e Hart, 1983) al 60% (Hayes. e Mooney, 1985.) dei casi senza peraltro indicare se si tratta di lesioni tra loro indipendenti (origine multicentrica) o se sia invece una metastatizzazione intramammaria della medesima lesione. In gatte con tumore unico la sopravvivenza è risultata migliore rispetto a gatte con tumore multiplo (Weijer e Hart, 1983.). Le linee ghiandolari destra e sinistra hanno la stessa probabilità di essere colpite; all'interno della stessa linea mammaria la ghiandola più craniale e quella più caudale sono le più frequentemente soggette a neoplasia (Hahn *et al.*, 1994).

L'età media degli animali alla quale viene effettuata la diagnosi di tumore alla ghiandola mammaria è di 10,8 anni e il tempo medio di sopravvivenza dopo la diagnosi è di 12,3 mesi; questo breve periodo di sopravvivenza può essere correlato sia con il ritardo medio dai 5 ai 7 mesi dal momento del segnalamento della neoplasia da parte del proprietario al veterinario e il primo intervento chirurgico, sia con le dimensioni del tumore al momento della diagnosi (Weijer *et al.*, 1972; Weijer *et al.*, 1983); nel loro lavoro infatti Weijer e colleghi hanno correlato il volume del tumore al momento della diagnosi con il tempo di sopravvivenza così come mostrato nella tabella 1.

Volume del tumore (cm ³)	Numero di gatti	Tempo medio di sopravvivenza (mesi)	Numero e percentuale di gatti sopravvissuti in un anno
0-8	16	12.4	8 (50%)
9-27	15	6.8	4 (25%)
28-64	17	4.3	1 (6%)
>65	12	3.5	1 (8%)

Tabella 1: correlazione tra dimensione dei tumori e tempo di sopravvivenza secondo Weijer e colleghi, 1972.

L'azione degli steroidi sessuali femminili e in particolare degli estrogeni è coinvolta nei meccanismi eziopatogenetici dei tumori mammari: i gatti maschi sono raramente colpiti, le femmine intere sono sei volte più a rischio rispetto a quelle ovariectomizzate (Dorn *et al.*, 1968), l'ovariectomia tra gli otto e gli undici mesi di età lascia un margine di rischio del 17% e le gatte sterilizzate entro il primo calore non corrono praticamente alcun rischio di sviluppare questa neoplasia (Hayes e Mooney, 1985). L'ipotesi di una possibile eziologia virale per il carcinoma mammario felino è stata descritta da alcuni autori sulla base dell'isolamento di particelle immunologicamente simili ai retrovirus (Feldman e Gross, 1971).

1.3 Classificazione e stadiazione dei tumori mammari

La classificazione dei tumori mammari del gatto viene effettuata seguendo i criteri dettati dalla WHO (World Health Organization) utilizzati per la classificazione del tumore mammario nella donna (Misdorp *et al.* 2001). Secondo tali criteri una classificazione istogenetica risulta difficoltosa per l'incerta origine dei tipi cellulari specifici di molti tumori e per le idee contrastanti circa il ruolo delle cellule mioepiteliali nella genesi di tumori misti e complessi. Scompaiono pertanto i termini "duttale", "duttulare" e "lobulare" usati in classificazioni precedenti (Hampe *et al.*, 1974). Le neoplasie mammarie feline vengono quindi distinte in base a criteri di morfologia descrittiva secondo quanto segue:

1 NEOPLASIE MALIGNNE

- 1.1 Carcinoma in situ
- 1.2 Carcinoma tubulopapillare
- 1.3 Carcinoma solido
- 1.4 Carcinoma cribriforme
- 1.5 Carcinoma squamoso
- 1.6 Carcinoma mucoso
- 1.7 Carcinosarcoma
- 1.8 Carcinoma o sarcoma in tumori benigni

2 NEOPLASIE BENIGNE

- 2.1 Adenoma
 - 2.1.1 Adenoma semplice
 - 2.1.2 Adenoma complesso
- 2.2 Fibroadenoma
 - 2.2.1 Fibroadenoma a bassa cellularità
 - 2.2.2 Fibroadenoma ad alta cellularità
- 2.3 Tumore misto benigno
- 2.4 Papilloma duttale

3 TUMORI NON CLASSIFICATI

4 IPERPLASIA/DISPLASIA MAMMARIA

4.1 Iperplasia duttale

4.2 Iperplasia lobulare

4.2.1 Iperplasia epiteliale

4.2.2 Adenosi

4.2.3 Ipertrofia mammaria felina

4.3 Ciste

4.4 Ectasia duttale

4.5 Fibrosclerosi

Tra i "TUMORI NON CLASSIFICATI" (punto 3 della classificazione WHO) possono essere inclusi il "carcinoma lipid-rich" (Kamstock *et al.*, 2005) e il carcinoma infiammatorio (Pérez-Alenza *et al.*, 2004).

Alla descrizione morfologica della classificazione WHO vengono poi associati altri parametri quali: il numero di mitosi, la formazione di tubuli e il pleomorfismo cellulare e nucleare (valutato come regolarità nelle dimensioni e nella forma). Tali parametri definiscono il grading ovvero il grado di differenziazione istologica, permettendo quindi di classificare le neoplasie in grado 1, 2, 3 secondo quanto descritto nelle tabella 2 e 3 (Elston e Ellis, 1991; Castagnaro *et al.* 1998). Nei tumori mammari di gatto il grado di differenziazione è indicativo del comportamento biologico della neoplasia stessa: un minor grado di differenziazione corrisponde ad una maggiore malignità (MacEwen e Withrow, 1996) pertanto può essere rilevante aggiungere tale parametro alla diagnosi morfologica delle forme maligne.

Caratteristiche	Punteggio
Grado di formazione di tubuli	
Alto (>75%)	1
Moderato (10-75%)	2
Basso o nullo (<10%)	3
Pleomorfismo cellulare e nucleare	
Nuclei e cellule piccoli, regolari e uniformi	1
Aumento moderato di dimensioni e della variabilità	2
Marcato aumento di dimensioni e variabilità	3
Indice mitotico (numero di mitosi in dieci campi microscopici 40X)	
0-7	1
8-14	2
≥15	3

Tabella 2: valutazione del grading dei carcinomi mammari felini. Modificata da: Castagnaro *et al.*, 1998.

Punteggio ottenuto	Grado	Caratteristiche istologiche
Tra 3 e 5	1	Ben differenziato
Tra 6 e 7	2	Moderatamente differenziato
Tra 8 e 9	3	Scarsamente differenziato

Tabella 3: Rlazione tra punteggio ottenuto, grading corrispondente e caratteristiche istologiche. Modificata da: Castagnaro *et al.*, 1998.

Similare rilevanza clinica dell'andamento del tumore assume lo staging che definisce invece lo stato clinico della neoplasia al momento della diagnosi; esso considera quattro stadi valutando le dimensioni del tumore primario (T), l'interessamento dei linfonodi regionali (N) e la presenza di metastasi sistemiche (M) (vedi tabella 4).

Tumore primario T		Linfonodi regionali N		Metastasi M	
TX	Non evidenziato	N0	Assenza di metastasi	M0	Assenti
T1	Inferiore a 2 cm	Istologicamente rilevabili		M1	Presenti
T2	Tra 2 e 3 cm	N1	Presenza di metastasi		
T3	Superiore a 3 cm	Istologicamente rilevabili			

Tabella 4: sistema di classificazione TNM per le neoplasie mammarie feline (Owen, 1979).

In base al sistema TNM le neoplasie vengono quindi suddivise in 4 stadi (tabella 5):

Stadio	Distribuzione di:		
	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0/N1	M0
IV	Ogni T	Ogni N	M1

Tabella 5: Staging delle neoplasie mammarie feline (Owen, 1979).

1.4 Aspetti prognostici del tumore mammario

Secondo quanto descritto in letteratura il fattore prognostico più importante nelle neoplasie mammarie feline è la dimensione del tumore: in aggiunta a quanto già riportato da Weijer e colleghi relativamente al volume del tumore (Weijer et al., 1973), studi più recenti riportano che gatti con tumori di diametro maggiore di 3 cm (T3) hanno un tempo di sopravvivenza di 4-6 mesi dopo la mastectomia; gatti con tumore tra i 2 ed i 3 cm (T2) hanno una media di sopravvivenza di 20 mesi, mentre i gatti che hanno un tumore di diametro inferiore ai 2 cm (T1) sopravvivono in genere più di 3 anni (Weijer e Hart, 1983; MacEwen *et al.*, 1984; Hayes e Mooney, 1985; Ito *et al.*, 1996; Castagnaro *et al.*, 1998).

Altri importanti fattori prognostici sono:

Invasività della lesione neoplastica: per definizione il carcinoma in situ è confinato al sistema duttale e non può metastatizzare. L'eventuale insorgenza di metastasi è da ricondursi ad un mancato rilevamento dell'invasività al momento della diagnosi.

Grading e Staging: più il grado e lo stadio sono di valore elevato, più la prognosi peggiora: in particolare ad un anno di distanza dall'intervento chirurgico per i tumori di grado 1 la mortalità è dello 0%, per i tumori di grado 3 è del 100% e per i tumori di grado 2 è del 42,4% (Castagnaro *et al.*, 1998). Il sistema di classificazione di Elston e Ellis (Elston e Ellis, 1991) risulta avere valore predittivo rispetto ai gradi 1 e 3, mentre il grado 2 sembra non avere valore prognostico (c'è una minima differenza tra il numero dei vivi, 57,6% e quello dei deceduti, 42,4%) (Castagnaro *et al.*, 1998). Il 50% dei gatti con carcinoma con valore di grading basso sopravvive per altri 12 mesi dopo la diagnosi, mentre solo il 10% dei gatti con carcinoma caratterizzato da grading elevato sopravvive così a lungo (Hahn *et al.*, 1994).

Tipo di terapia: la terapia chirurgica, che non costituisce però una cura, risulta essere il trattamento d'elezione. In particolare la mastectomia radicale, che consiste nella rimozione di tutte le ghiandole, sane e malate, e dei linfonodi associati, è correlata con un periodo più lungo di assenza della malattia mentre non sembra influenzare in modo significativo il tempo di sopravvivenza (MacEwen *et al.*, 1984; Hahn *et al.*, 1994).

Età: l'età media di insorgenza del tumore alla ghiandola mammaria è di 10 anni. L'età di insorgenza ha poco valore prognostico eccetto che per il Siamese; in questa razza infatti sembra che il rischio di sviluppare carcinomi mammari sia doppio rispetto alle altre razze e lo sviluppo del tumore inizi

ad una età più giovane (Hayes *et al.*, 1981; Hahn *et al.*, 1994).

Estensione della necrosi: è indicativa di una neoplasia con elevata velocità di crescita e diametro elevato e quindi è associata ad una prognosi peggiore (Weijer *et al.*, 1983). L'infiltrato linfoplasmacellulare periferico nel gatto è correlato negativamente con la prognosi (Weijer *et al.*, 1983), probabilmente in quanto conseguente alla necrosi frequentemente rilevata nei carcinomi mammari felini. Nel cane, al contrario, la presenza di una reazione linfoide indica un'importante reazione immunologica diretta contro la neoplasia. I cani che non presentano reazione linfoide al momento della mastectomia iniziale hanno un rischio tre volte maggiore di sviluppare recidive o metastasi entro due anni rispetto ai cani che presentano infiltrato infiammatorio (MacEwen, 1990). Per quanto riguarda il tipo istologico, si deve fare una considerazione a parte: mentre nel cane la nuova classificazione WHO basata sui criteri morfologici acquisisce anche valore prognostico in quanto le tipologie istologiche indicate correlano con un grado di malignità crescente, nel gatto le conoscenze attuali non permettono di effettuare tale correlazione impedendo una classificazione con valore prognostico dei carcinomi maligni secondo le caratteristiche istologiche (Weijer *et al.*, 1983; McEwen *et al.*, 1984).

1.5 Terapia

In aggiunta al semplice trattamento chirurgico nel gatto in caso di tumori di dimensioni elevate, emboli neoplastici o metastasi disseminate ai linfonodi regionali o in circolo è suggerito l'impiego della chemioterapia: i carcinomi mammari felini, a differenza di quelli del cane, rispondono in maniera più costante alla chemioterapia soprattutto utilizzando associazioni di doxorubicina con ciclofosfamide, similmente a quanto accade in umana (MacEwen, 1990; Vail e MacEwen, 2000).

L'immunoterapia può essere una terapia di successo se si riscontra la presenza di antigeni tumorali sulle cellule neoplastiche che possono essere così aggredite da cellule immunocompetenti; tuttavia per quanto riguarda la gatta i dati sono scarsi e indicano risultati minimi (MacEwen, 1990).

La terapia ormonale largamente utilizzata in terapia umana viene applicata solo ai tumori positivi ai recettori degli estrogeni utilizzando farmaci antiestrogenici come il tamoxifene. Questo farmaco compete con gli estrogeni nel legame con i loro recettori formando dei complessi inattivi sulla regolazione genica. Secondo alcuni autori questa terapia trova scarsa utilità nel gatto per la bassa positività ai recettori estrogenici nei tumori maligni di questa specie (Hamilton *et al.*, 1976).

1.6 Il tumore mammario nel gatto come modello umano

L' utilizzo degli animali come modello per chiarire la patogenesi dei tumori e per lo studio preclinico della terapia tumorale ha portato a importanti conoscenze su nuove e innovative terapie. La maggior parte di questi studi, effettuata su animali da laboratorio, lascia però qualche perplessità circa l'applicabilità delle informazioni acquisite sulle neoplasie che si sviluppano in modo naturale nell'uomo. L'impiego di animali da compagnia, nei quali i tumori non sono sperimentalmente indotti, oltre a dissipare le perplessità precedentemente accennate, costituisce una eccellente opportunità per lo studio degli aspetti di malignità dei tumori dall'eziologia al trattamento (Vail e MacEwen, 2000). Gli animali da compagnia, infatti, condividono con l'uomo l'ambiente in cui vivono e quindi, i fattori ambientali simili che contribuiscono alla carcinogenesi. In generale l'incidenza di tumori maligni negli animali da compagnia è più elevata e ciò comporta una più ampia popolazione su cui effettuare ricerche. Generalmente poi i tumori negli animali da compagnia progrediscono con una velocità maggiore rispetto all'uomo; questo permette di ottenere più dati in minor tempo. Inoltre, in virtù della loro taglia, la tipologia dei campioni e il tipo di interventi chirurgici sono più simili all'uomo e sono più effettuabili rispetto agli animali da laboratorio; successivamente ad una asportazione chirurgica di una massa tumorale, per esempio, la quantità di tessuto tumorale è tale da permettere un numero elevato di esami.

Il tumore della ghiandola mammaria nella gatta trova molte correlazioni di tipo clinico, biologico e patologico con il cancro alla mammella della donna. Infatti, sia nella donna sia nel gatto si osserva una frequenza elevata di carcinomi mammari in particolare di forma infiltrante e le due specie si accomunano per diversi fattori prognostici quali le dimensioni della neoplasia, il grading e la frequenza elevata di formazione di metastasi. Inoltre le due specie mostrano sensibilità all'immunoterapia e alla terapia ormonale (Dorn *et al.*, 1968; Weijer *et al.*, 1972; Hayes *et al.*, 1981; Weijer e Hard, 1983; Hahn *et al.*, 1994).

Per quanto riguarda il gatto, il Siamese è l'unica razza caratterizzata da predisposizione allo sviluppo di neoplasia e per questo è preso come modello per lo studio del rischio familiare nelle donne aventi in famiglia almeno un caso di tumore al seno (Hayes *et al.*, 1981).

I fattori prognostici più importanti nel gatto e nella donna (confronta: Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system) sono messi a confronto nella tabella 6.

Fattori prognostici	Donna	Gatta
Localizzazione	No	No
Dimensione del tumore	Sì	Sì
Staging	Sì	Sì
Tipo istologico	Sì	No
Grading	Sì	Sì
Infiltrazione	Sì	Sì
Coinvolgimento linfonodi regionali	Sì	Sì

Tabella 6: fattori prognostici della donna e del gatto nelle neoplasie mammarie (Misdorp, 2002)

1.7 Cellule epiteliali, cellule mioepiteliali e cellule multipotenti: istogenesi e tumorigenesi

L'epitelio ghiandolare mammario è stato descritto per anni come costituito da due popolazioni cellulari morfologicamente distinte: le cellule ghiandolari luminali e le cellule mioepiteliali basali. In sezione queste cellule venivano distinte per la loro localizzazione e per l'espressione di citocheratine di tipo I semplice (citocheratine 8/18/19) (cellule luminali) e per l'espressione di actina muscolare liscia (cellule mioepiteliali). Alveoli e dotti intralobulari (vedi capitolo 1.1) risultano rivestiti da epitelio cubico semplice circondato da uno strato di cellule mioepiteliali. La parte terminale dei dotti intralobulari è caratterizzata da un ispessimento cellulare ("terminal end buds",TEB) che probabilmente rappresenta un residuo ghiandolare o un precursore della stessa ghiandola nella fase inattiva. Nonostante questa struttura sia riconoscibile soprattutto nella fase di sviluppo della mammella negli animali puberi, si ipotizza che esistano delle strutture simili alle estremità dei dotti in crescita anche durante altri stadi di sviluppo della ghiandola. A livello dei TEB è stato riconosciuto un tipo particolare di popolazione cellulare che forma un monostrato di cellule basali, detto "cap cells" (Williams *et al.*,1983; Deugnier M.A. *et al.*, 2002)

Le cellule mioepiteliali si trovano a ridosso della membrana basale e grazie a dei prolungamenti citoplasmatici entrano in stretto contatto con lo strato luminale. A seconda del momento fisiologico le cellule mioepiteliali possono presentare forma più o meno appiattita, stellata o simile a un fibroblasto (figura 1).

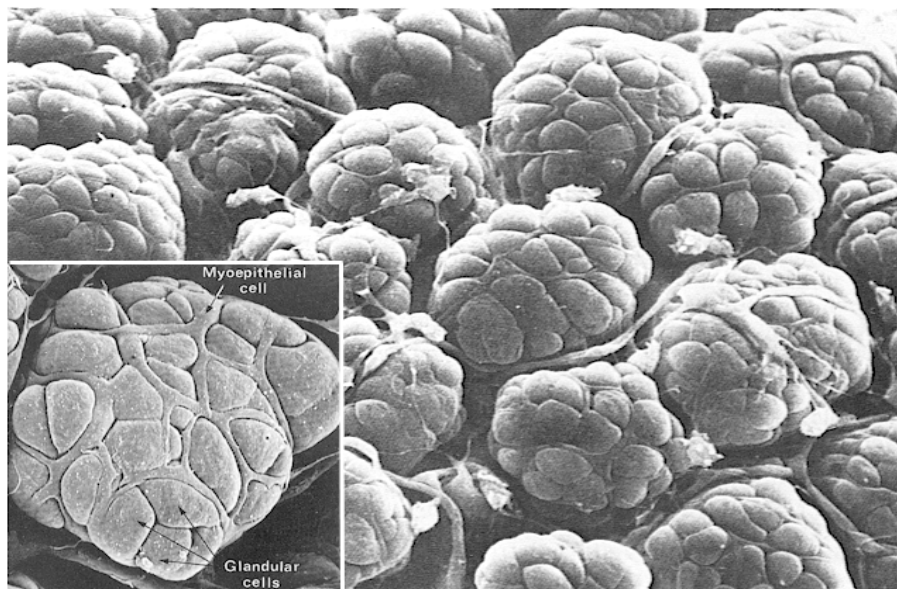


Figura 1: Struttura alveolare della ghiandola mammaria osservata tramite microscopio elettronico (University of Delaware Department of Biological Science, <http://www.udel.edu/Biology/Wags/histopage/ampage/efr/efr.htm>)

Esse hanno la funzione principale di contrarsi sotto l'effetto dell'ossitocina prodotta dalla neuroipofisi, cosicché il secreto contenuto nel lume alveolare venga sospinto verso il sistema duttale; questo processo è detto "caduta del latte".

Nello studio degli elementi cellulari presenti nella ghiandola mammaria vengono presi in considerazione componenti del citoscheletro ed altri filamenti citoplasmatici e molecole legati alla differenziazione della cellula e/o indicativi dell'origine istogenetica. Il citoscheletro è una struttura che funge da impalcatura e permette il mantenimento della forma naturale e del posizionamento degli organuli cellulari e del nucleo e protegge la cellula stessa dagli insulti meccanici. Inoltre controlla il movimento degli organuli e dirige lo spostamento delle vescicole.

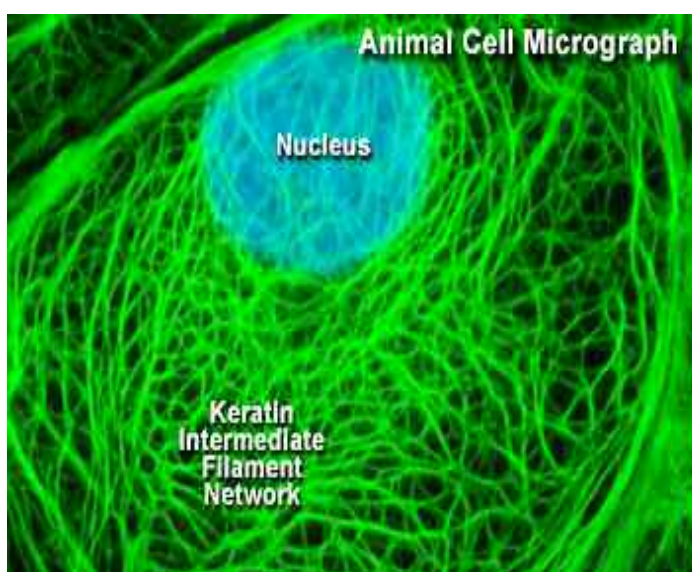


Figura 2: Rete di filamenti intermedi che sostengono la struttura cellulare. Immagine digitale ottenuta con microscopio ottico a fluorescenza. Da, "Molecular expression™", www.microscopy.fsu.edu

I tre principali componenti del citoscheletro sono i filamenti intermedi, i micro-filamenti di actina e i microtubuli. I filamenti intermedi si distinguono in 5 classi proteiche: le citocheratine, la vimentina, la desmina, i filamenti gliali e i neurofilamenti. Essi sono associati alla formazione di desmosomi ed emidesmosomi che mantengono i contatti tra cellule vicine (desmosomi) e tra le cellule e la membrana basale (emidesmosomi), e sono connessi alle strutture di actina citoscheletriche. Le citocheratine vengono usualmente suddivise in due gruppi principali: le citocheratina acide e quelle basiche. I membri delle due subfamiglie sono di solito espressi in coppia nei vari tipi di epitelii, cioè ad ogni citocheratina acida ne corrisponde una di tipo basico. Inoltre si ha corrispondenza tra la categoria di pH nella quale rientrano e il loro peso molecolare, infatti le citocheratine basiche sono quelle a più alto peso molecolare e vanno dalla CK 1 (68 kDa)

fino alla CK 6 (56 kDa), mentre le acide hanno peso molecolare minore e comprendono le citocheratine dalla CK 9 (64 kDa) alla CK 19 (40 kDa). Le CK 7 (54 kDa) e la CK 8 (52,2 kDa) sono invece considerate di peso e carica elettrica intermedia (Moll *et al.*, 1982). Anche la vimentina appartiene al gruppo dei filamento intermedi, e sembra avere un ruolo particolare nel mantenere l'integrità del citoplasma, stabilizzando le interazioni citoscheletriche delle cellule di origine mesenchimale. Studi effettuati su topi transgenici in cui il gene della vimentina non viene espresso, non hanno comunque evidenziato alterazioni funzionali (Fuchs e Weber, 1994). Si è quindi ipotizzato che la mancanza della vimentina sia compensata da un maggior sviluppo del network di microtubuli, suggerendo la possibilità di un'intima interazione tra i due componenti del citoscheletro. Nella ghiandola mammaria l'espressione della vimentina è evidenziabile nelle cellule mioepiteliali e nelle cellule di origine mesenchimale (fibroblasti, miofibroblasti) (Gould *et al.*, 1990). L'aumento dell'espressione della vimentina nelle cellule mioepiteliali della ghiandola mammaria durante l'allattamento suggerisce che la vimentina giochi un ruolo importante nel meccanismo che coinvolge le cellule mioepiteliali e che viene descritto come "caduta del latte" (Michalczyk *et al.*, 2000). L'espressione della vimentina nei carcinomi mammari è stata raramente evidenziata e comunque con una percentuale di espressione nella popolazione neoplastica inferiore al 10% (Dabbs, 2006).

Per quanto riguarda l' α -actina muscolare liscia (α -sma), essa è una proteina di 42-47 kDa appartenete alla categoria dei microfilamenti con struttura globulare che viene espressa nelle cellule con capacità contrattile. L'uso di anticorpo anti- α -SMA permette di individuare le cellule muscolari lisce, le cellule mioepiteliali e i miofibroblasti presenti, quest'ultimi, nelle lesioni fibroblastiche benigne e reattive (Lazard *et al.*, 1993).

Un altro marcatore molecolare che viene utilizzato per la caratterizzazione delle componenti cellulari della ghiandola mammaria è la calponina. La calponina è una proteina specifica della muscolatura liscia ed esiste in due isoforme: la prima di 29 KD, è caratteristica del tratto urogenitale, la seconda, di 34 KD si trova nella muscolatura liscia vasale e viscerale. A livello mammario l'espressione della calponina è stata riconosciuta nelle cellule muscolari lisce dei vasi sanguigni, nelle cellule mioepiteliali e nei miofibroblasti (Lazard *et al.*, 1993). La distinzione delle cellule mioepiteliali dai miofibroblasti può essere effettuata, quando la morfologia cellulare e l'architettura tissutale non la rendono possibile, valutando l'espressione della CK14 (Yaziji *et al.*, 2000; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2002). Diversi studi (Dabbs e Gown, 1999; Damiani *et al.*, 1999; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2002) hanno confermato che la calponina è un marcatore

specifico delle cellule mioepiteliali nel tessuto sano mammario e nelle neoplasie nell'uomo e nel cane).

Evidenze sempre maggiori indicano che il modello “a due cellule” utilizzato per decenni per descrivere la struttura ghiandolare mammaria sia troppo semplicistico e che la ghiandola mammaria sia invece caratterizzata da una struttura epiteliale più complessa, assimilabile a quella dell'epidermide o della prostata. In alcuni studi si evidenzia la presenza di un terzo tipo di cellula caratterizzata dall'espressione di citocheratine specifiche delle cellule basali, citocheratina 5, 6 e citocheratina 14, e localizzata sia nel comparto basale/parabasale che nello strato luminale. Inizialmente tali cellule sono state considerate delle cellule mioepiteliali ma successivamente si è proposto che costituissero delle cellule progenitrici della ghiandola mammaria. Un recente studio che ha impiegato tecniche di western blotting e analisi a immunostochimiche ha evidenziato la presenza di cellule progenitrici positive alla citocheratine 5 e 14 nel parenchima mammario in grado di differenziarsi in cellule ghiandolari e cellule mioepiteliali attraverso elementi cellulari ibridi intermedi. Questo modello, in cui vengono descritte delle cellule progenitrici si è dimostrato utile nel descrivere tipi diversi di proliferazioni epiteliali intraduttali, carcinomi in situ e carcinomi infiltranti (Bocker *et al.*, 1993).

In tabella 7 viene descritta la distribuzione dei marcatori molecolari utilizzati per la caratterizzazione delle popolazioni cellulari della ghiandola mammaria.

MARCATORE MOLECOLARE	CELLULA	CELLULA	MIOEPELILIO	CELLULE	
	EPITELIALE LUMINALE	EPITELIALE BASALE		MUSCOLARI E MIOFIBROBLASTI	FIBROBLASTI
Citocheratine	+	+	+	-	-
CK 5/6	-	+ ^{1,2}	+ ²	-	-
CK 7,8,18,19	+ ^{1,2}	-	-	-	-
CK 14	-	+ ¹	+ ³	-	-
Calponina	-	-	+ ⁴	+ ⁴	-
A-SMA	-	-	+ ³	+ ³	-
Vimentina	-	-	+ ⁵	+	+

Tabella 7: Positività immunostochimica delle cellule componenti la ghiandola mammaria umana rispetto ai vari anticorpi/marcatori cellulari.

¹Ba'nkfalvi *et al.*, 2004

²Papadimitriou *et al.* 1989

³Yaziji *et al.*, 2000

⁴Winder *et al.*, 1993

⁵Gould *et al.*, 1990

L'origine istologica delle cellule che costituiscono l'albero ghiandolare mammario è tutt'oggi controversa, in particolar modo per quanto riguarda le cellule mioepiteliali: da un lato, studi effettuati sui TEB (figura 3) indicano che le così dette “cap cells”, localizzate al di sopra della membrana basale nei dotti terminali e che non sembrano esprimere marcatori muscolari, possano migrare nella parte più prossimale del dotto in crescita differenziandosi in cellule mioepiteliali (Williams *et al.*, 1983; Deugnier *et al.*, 2002). Dall'altro lato non è però credibile che le uniche cellule progenitrici delle cellule mioepiteliali siano le “cap cells”. Studi svolti nel topo e nella donna indicano infatti la presenza di cellule multipotenti distribuite in tutta la ghiandola mammaria, e non concentrate in un sito specifico (R. Dulbecco *et al.*, 1986; Smith e Medina, 1988; Deugnier *et al.*, 2002).

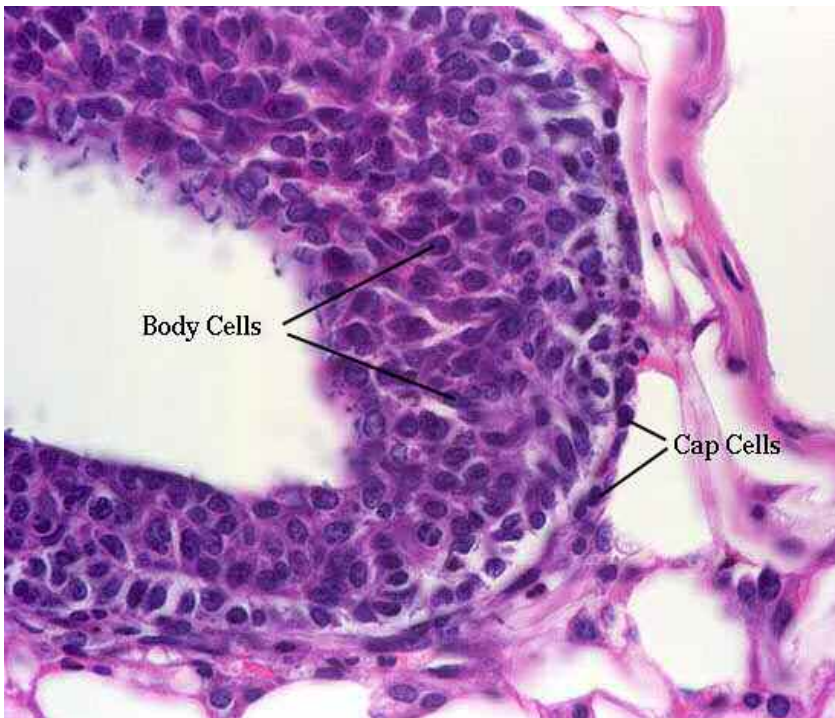


Figura 3: Particolare del TEB. Si nota l'ispessimento epiteliale (“Body Cells”) e lo strato basale rappresentato dalle “Cap Cells”. Da “Biology of the mammary gland”, <http://mammary.nih.gov>.

In alcuni studi si evidenzia che elementi progenitori sia delle cellule epiteliali luminali che delle cellule mioepiteliali siano localizzati a livello luminale (Péchoux *et al.*, 1999). Altri studi ipotizzano che lo sviluppo della ghiandola mammaria dipenda da una gerarchia di cellule progenitrici che diventano sempre più “specializzate” e quindi “ristrette” nelle loro capacità proliferative (Stingl *et al.*, 2005). Si ipotizza infatti che possano esistere cellule a degli stadi intermedi tra le cellule staminali/multipotenti e quelle completamente differenziate, e che esse

presentino una incompleta differenziazione e una capacità proliferativa ridotta (A. Bankfalvi *et al.*, 2004; Behbod *et al.*, 2004; Clayton *et al.*, 2004). Da studi effettuati sulla ghiandola mammaria di topo (G.H. Smith *et al.*, 2002), è stata messa in evidenza l'esistenza di una popolazione di cellule staminali che può dare origine sia a strutture duttali che alveolari. Il tipo di differenziazione della cellula staminale/multipotente non sembra però essere unicamente determinato dalle proprietà intrinseche della cellula stessa, ma anche all'influenza dei segnali che le vicine cellule somatiche le inviano e dal substrato in cui vengono inserite.

Studi biochimici sul citoscheletro delle cellule di carcinoma umano mostrano che i tumori che derivano da determinati tipi di epitelio sono caratterizzati da pattern di espressione cheratinici caratteristici. I pattern di espressione cheratinica risultano inoltre uguali nelle lesioni primarie e nelle metastasi, indipendentemente dalla localizzazione e dalle dimensioni della neoplasia. In generale i tumori che derivano da un epitelio mantengono l'espressione di molti dei polipeptidi citocheratinici tipici delle cellule da cui derivano (Moll *et al.*, 1982). L'osservazione che in alcuni tipi di tumore i polipeptidi cheratinici specifici del tessuto normale di origine non siano espressi o, al contrario, il fatto che alcuni tumori esprimano principalmente citocheratine che sono invece minimamente espresse nei tessuti di origine, può trovare spiegazione nell'eterogeneità dei tipi cellulari che costituiscono i tessuti e nella selezione delle cellule determinata dalla proliferazione tumorale. Il significato biologico della diversa espressione dei polipeptidi citocheratinici nei carcinomi mammari non è chiaro, ma per quanto non sia possibile al momento stabilirne il ruolo, numerosi studi in medicina umana evidenziano che il pattern di espressione può essere utilizzato per distinguere i diversi tipi di proliferazioni epiteliali benigne e maligne e può essere correlato con il grado di malignità di una neoplasia (Jarasch *et al.*, 1988; Malzahn *et al.*, 1998; Otterbach *et al.*, 2000). Studi di micro-array effettuati su carcinomi mammari nella donna hanno evidenziato che tumori definiti "basal-like", che esprimono cioè marker citocheratinici specifici degli strati basali degli epitelii (citocheratine 5, 6 e 14), sono per lo più caratterizzati da una mancanza di espressione di recettori ormonali e di HER-2, da un comportamento clinico più aggressivo, da un pattern di metastatizzazione specifico e da una prognosi peggiore rispetto anche le convenzionali terapie (Pinho *et al.*, 2000; Pusztai *et al.*, 2006).

In un interessante lavoro, Bankfalvi e collaboratori (Bankfalvi *et al.*, 2004) hanno confrontato l'attività proliferativa delle cellule epiteliali basali, luminali e delle cellule mioepiteliali in lesioni proliferative benigne, in lesioni maligne ai primi stadi di sviluppo e nel tessuto ghiandolare sano nella donna. La distinzione delle diverse tipologie cellulari è stata effettuata

valutando dal punto di vista immunohistochimico l'espressione di diverse citocheratine. Nella ghiandola mammaria sana erano distinguibili le tre componenti cellulari (luminali, basali e mioepiteliali). La frazione di cellule in crescita era costituita principalmente da cellule caratterizzate dall'espressione di citocheratine 8 e 18 localizzate principalmente a livello luminale, mentre si osservava un indice di proliferazione molto più basso per le cellule epiteliali basali caratterizzate da espressione di citocheratine 5/6 e 14. Le cellule mioepiteliali presentavano positività sporadica. Nelle lesioni proliferative benigne si osservava la presenza di tutti e tre i "fenotipi" epiteliali evidenziati nella ghiandola mammaria normale, ma con distribuzione e architettura diversa. Nell'iperplasia lobulare (adenosi) i valori della frazione di crescita ricalcavano in qualche modo i risultati della ghiandola mammaria sana. Nell'iperplasia duttale si osservava invece la proliferazione intraduttale di una popolazione costituita da elementi epiteliali basali, luminali e da elementi localizzati a livello intraluminale che esprimevano un pattern citocheratinico misto (CK5, 14, 8 e 18). La popolazione cellulare positiva a CK8, 18 e 19 evidenziava un indice di proliferazione inferiore rispetto alla ghiandola sana e all'adenosi mentre si evidenziava una frazione di crescita superiore a tutte le altre lesioni oggetto di studio per le cellule positive a CK5 e CK14, localizzate principalmente a livello luminale. Diversamente dalle composizione eterogenea delle lesioni proliferative benigne, le lesioni maligne allo stadio iniziale (iperplasie atipiche e carcinoma in situ) erano costituite da un'unica tipologia cellulare che esprimeva principalmente citocheratine 8/18/19; l'eterogeneità di espressione molecolare di una proliferazione cellulare potrebbe perciò essere uno strumento per la differenziazione delle lesioni benigne dalle maligne (Bankfalvi *et al.*, 2004). Dallo stesso lavoro si evidenziava come le cellule mioepiteliali fossero caratterizzate da una frazione di crescita sempre bassa suggerendo che tali cellule non fossero parte integrante dei processi proliferativi ma giocassero piuttosto un ruolo nel processo reattivo. Tale considerazione si trova in disaccordo con i risultati degli studi molecolari di Lakhani e colleghi (Lakhani *et al.*, 1999) che evidenziano invece una perdita di eterozigosi nelle cellule mioepiteliali localizzate in prossimità e a distanza delle lesioni neoplastiche. La valutazione dal punto di vista immunohistochimico della popolazione mioepiteliali, viene effettuata utilizzando principalmente anticorpi anti-calponina, anti-alfa-sma e anti-p63. Tale valutazione assume, in medicina umana un forte valore prognostico in quanto l'evidenziazione di uno strato continuo di elementi mioepiteliali è determinante per la distinzione dei carcinomi infiltranti dai carcinomi in situ e dalle lesioni iperplastiche atipiche (Gould *et al.*, 1980; Gusterson *et al.*, 1982). Il ruolo delle cellule mioepiteliali nello sviluppo delle neoplasie mammarie è oggetto di studio anche nel cane, in particolar modo per quel che riguarda

l'istogenesi dei carcinomi complessi e dei tumori misti (Vos *et al.*, 1993; Smiech *et al.*, 2002; Sorenmo, 2003; Ramalho *et al.*, 2006). I pochi studi in letteratura che riguardano la caratterizzazione e la differenziazione delle diverse componenti cellulari della ghiandola mammaria e dei tumori mammari del gatto evidenziano infine che, come nella donna, anche in questa specie le neoplasie mammarie presentano “immunofenotipi” eterogenei di espressione dei filamenti intermedi. (Martin de las Mulas *et al.*, 1994; Seixas *et al.*, 2007).

1.8 Tumori mammari e recettori ormonali

1.8.1 Struttura, modalità di attivazione e ruolo nelle neoplasie mammarie del recettore degli estrogeni

Gli estrogeni esercitano la loro azione sulla cellula bersaglio conseguentemente al legame con due diversi recettori proteici, localizzati prevalentemente (97%) sulla membrana nucleare (Razandi *et al.*, 1999), appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari: il recettore alfa ($Er\alpha$) e il recettore beta ($Er\beta$). I due recettori, codificati nell'uomo su geni diversi, localizzati rispettivamente sul cromosoma 6 e sul cromosoma 14, pur presentando alcune differenze nella composizione aminoacidica, sono caratterizzati dalla stessa organizzazione in domini proteici. Distinguiamo, infatti, su entrambi i recettori, un dominio di legame con il DNA in corrispondenza del terminale amminico e un dominio di legame con l'ormone all'estremità carbossilica. Entrambi i recettori presentano poi due siti per l'attivazione della trascrizione denominati AF1 e AF2; AF1 si trova all'interno del dominio di legame con il DNA, AF2 è compreso nel dominio di legame con il recettore. Infine è presente in entrambi un segnale per la traslocazione della proteina nel nucleo della cellula.

Sono state descritte varie modalità di attivazione dei recettori; tra queste la più conosciuta è la via classica. Secondo tale via il legame ormone-recettore determina una variazione conformazionale del recettore che porta a formazione di omodimeri. Questi interagiscono per mezzo del dominio legante il DNA prima con gli EREs (Estrogen Response Element), elementi di risposta agli estrogeni localizzati in prossimità del gene bersaglio, poi con un coattivatore, una proteina che funge da "ponte" tra il dimerico e l'apparato di trascrizione, modificando i livelli di trascrizione dei geni regolati dagli estrogeni. In particolare vengono attivati geni codificanti la ciclina D1 e la c-Myc, proteine coinvolte nel ciclo cellulare. L'aumento della concentrazione cellulare di queste proteine ha come diretta conseguenza l'attivazione a "cascata" delle chinasi che determinano il passaggio della cellula dalla fase di quiescenza (G) a quella di sintesi (S), avviandola alla mitosi.

Il recettore per gli estrogeni può essere attivato anche da progestinici sintetici ad alte dosi, dal T3 e dagli xenoestrogeni. Oltre alla via classica esistono altre vie alternative di attivazione dei recettori: varianti della proteina dell'ER possono diventare attive di per sé senza bisogno di

attivazione da parte degli estrogeni; l'attivazione può dipendere anche dal legame tra l'estradiolo e recettori della membrana plasmatica mediante meccanismo d'azione non chiaro (Ciocca *et al.*, 1997).

L'espressione del recettore alfa per gli estrogeni nei tumori mammari nella donna è, dal punto di vista clinico, un importante parametro prognostico per determinare il tipo di intervento terapeutico sul paziente e l'andamento stesso della malattia. Nella donna la percentuale di tumori positivi alla presenza del recettore alfa va dal 75% al 92% (Hopp e Fuqua, 1998; Fuqua, 2001; Shaw *et al.*, 2002). Diversi autori ritengono che l'espressione del recettore sia correlata con la progressione della malattia; infatti nelle cellule epiteliali della ghiandola sana l'espressione del recettore è in media del 7%, nelle lesioni preneoplastiche la percentuale aumenta e nei carcinomi invasivi ai primi stadi la percentuale media di positività è del 75% (Hopp e Fuqua, 1998; Misdorp, 2000). Solo i carcinomi invasivi agli ultimi stadi presentano spesso una notevole diminuzione dell'espressione del recettore. La presenza del recettore nella ghiandola mammaria sana costituisce quindi un fattore che correla positivamente con la prognosi della neoplasia (De las Mulas *et al.*, 2000).

Nella cagna la determinazione dei recettori per gli estrogeni nei tumori della ghiandola mammaria ha valore prognostico. La percentuale di tumori positivi all'espressione del recettore in questa specie è simile alla donna, 80-90%, mentre il tessuto sano, diversamente dalla donna, risulta positivo nel 99% dei casi (De las Mulas, 2000).

Nella gatta la relazione tra l'espressione dei recettori per gli estrogeni e la prognosi è ancora sconosciuta. I dati in letteratura riportano che i tumori maligni sono molto più frequenti rispetto al cane (86% nel gatto, 42% nel cane) ma solo una percentuale che va dal 10% al 40% dei casi risulta positiva all'espressione del recettore alfa degli estrogeni (Hahn *et al.*, 1994; De las Mulas *et al.*, 2000; Vail e MacEwen; 2000).

1.8.2 Struttura, modalità di attivazione e ruolo nelle neoplasie mammarie del recettore del progesterone

Il recettore del progesterone è un recettore steroideo intracellulare codificato da un unico gene localizzato sul cromosoma 11q22, di cui si conoscono due isoforme. Per ciascuna isoforma la struttura proteica risulta costituita da tre domini funzionali che includono: un dominio N-terminale, che costituisce la regione meno conservata per quanto riguarda lunghezza e sequenza aminoacidica nelle due isoforme del recettore, un dominio centrale per il legame con il DNA e un dominio C-terminale per il legame con il ligando. Il legame del progesterone con il recettore determina cambiamenti conformazionale della proteina a cui segue l'omodimerizzazione, il legame con il DNA e il richiamo di coattivatori per l'attivazione dell'apparato di trascrizione basale (vedi figura 4).

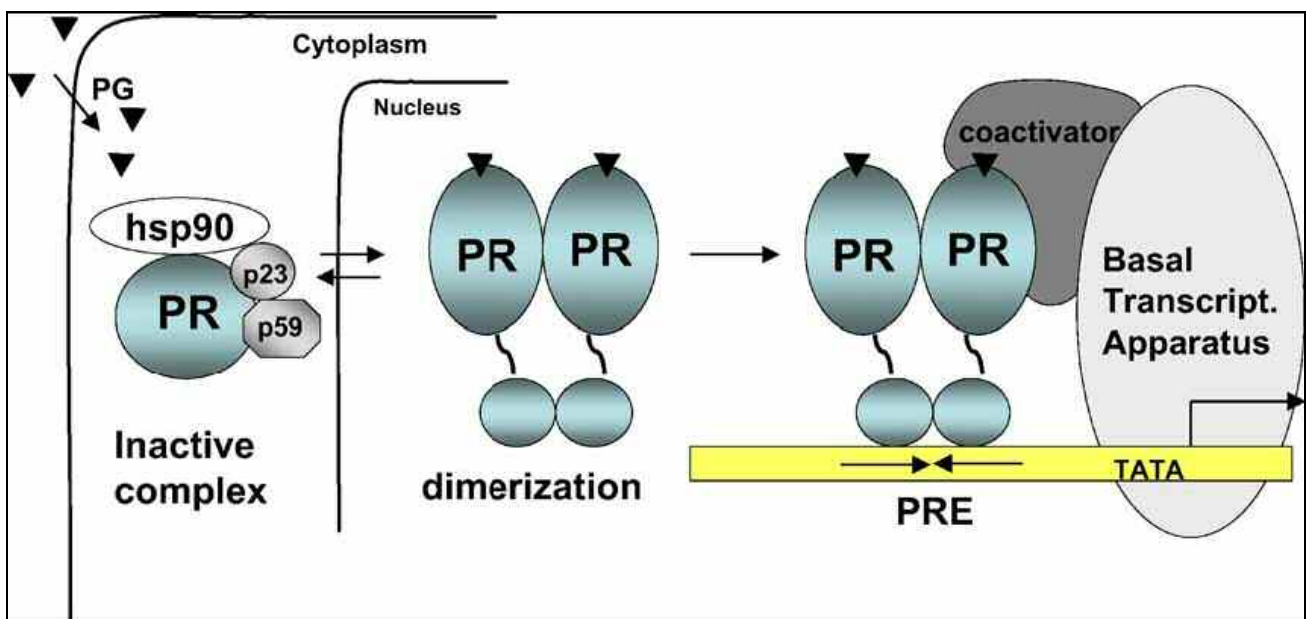


Figura 4: meccanismo di attivazione del recettore del progesterone. PG, progesterone; PR, recettore del Progesterone; PRE, elementi di risposta al progesterone; (Leonhardt et al, 2003)

Non tutti gli effetti del progesterone possono essere spiegati dal ruolo del recettore come fattore di trascrizione. Evidenze sempre maggiori indicano che il progesterone determina la propria azione, in maniera rapida, indipendentemente dai meccanismi di trascrizione genica intervenendo invece nella produzione di secondi messaggeri ed attivando vie di trasduzione (McEwen, 1991; Bayaa *et al.*, 2000; J. Tian *et al.*, 2000). In particolare nel cancro al seno della donna l'azione del

progesterone può venire a determinarsi attraverso l'attivazione della via Src/Ras/MAPK (Migliaccio *et al.*, 1998) Alcuni di questi effetti rapidi, non genomici, del progesterone, sono mediati, attraverso meccanismi ancora non del tutto chiariti, dal medesimo recettore nucleare del progesterone che regola la trascrizione (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2001).

Il progesterone è un ormone steroideo che funge da coordinatore dell'attività riproduttiva e gioca un ruolo chiave nella morfogenesi della ghiandola mammaria in relazione alla gravidanza e alla tumorigenesi. Il silenziamento dell'espressione del recettore per il progesterone tramite mutazione in topi Knock Out (KO) ha dimostrato il ruolo critico di tali recettori nella mediazione della proliferazione duttale, nella differenziazione lobulo-alveolare associata allo sviluppo e alla gravidanza e all'iniziazione e all'incidenza dei tumori mammari in risposta a stimoli carcinogeni (Conneely *et al.*, 2003). Oggetto di indagine sono i meccanismi d'azione autocina/paracrina che stanno alla base dello sviluppo della ghiandola mammaria e che caratterizzano i carcinomi. (Lydon *et al.*, 1996; Chappell *et al.*, 1999; Chatterton *et al.*, 2002). In alcuni studi di oncologia umana viene evidenziato il contrasto tra il contributo dei progestinici nella tumorigenesi della ghiandola mammaria e l'effetto protettivo degli stessi progestinici a carico dell'utero. (Paganini-Hill *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2002; Sitruk-Ware, 2002).

L'esigenza di valutare l'espressione del recettore del progesterone nei carcinomi mammari infiltranti nella donna deriva dal fatto che alcuni tumori, positivi all'espressione del recettore per gli estrogeni, non rispondono alle terapie ormonali. Poichè fisiologicamente l'induzione del recettore del progesterone dipende dal recettore degli estrogeni, la presenza del recettore del progesterone nelle neoplasie mammarie è considerata indicativa dell'integrità della via molecolare del recettore degli estrogeni (Kastner *et al.*, 1990; De las Mulas *et al.*, 2002). La valutazione del recettore del progesterone è quindi importante, dal punto di vista clinico, per predire la risposta ad una terapia ormonale e per avere un'indicazione prognostica nei tumori negli stadi iniziali (Clark *et al.*, 1983). I pochi studi che riguardano l'espressione del recettore del progesterone in lesioni mammarie premaligne e preinvasive sembrano evidenziare un incremento dell'atopia in associazione ad un aumento dell'espressione di tale recettore (Allred *et al.*, 2001). Ci sono inoltre numerosi dati che indicano che il rapporto tra le due isoforme del recettore sia alterato durante la tumorigenesi (Mote *et al.*, 2002). Circa il 60% dei carcinomi invasivi nella donna esprime il recettore del progesterone e i pazienti i cui tumori esprimono sia il recettore del progesterone che il recettore per gli estrogeni sono i più rispondenti alla terapia di tipo endocrino e hanno una prognosi migliore (Conneely *et al.*, 2003).

Al contrario di quanto avviene per la donna l'espressione del recettore del progesterone non è routinariamente valutata nei carcinomi mammari del cane e del gatto e tali specie non vengono sottoposte a terapie endocrine. Studi immunostochimici evidenziano una diminuzione dell'espressione del progesterone nei carcinomi infiltranti sia nel cane che nel gatto senza tuttavia evidenziare una correlazione con il tipo istologico o con il tempo di sopravvivenza (Millanta *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2006). Gli studi effettuati suggeriscono il cane come modello di studio per i tumori ormono-dipendenti della donna, mentre il gatto per lo studio dei tumori ormono-indipendenti (Martin *et al.*, 1984; Rutteman, 1990; Sartin *et al.*, 1992; Donnay *et al.*, 1993).

1.9 L'oncogene HER-2 nei tumori mammari

Il gene HER-2 è localizzato nell'uomo sul cromosoma 17 e codifica per un m-RNA (4.6 Kb) dal quale si producono, per eventi di splicing alternativo, trascritti codificanti per diverse isoforme della glicoproteina transmembranaria ad attività tirosin chinasi HER-2 (Casalini & Iorio, 2004; Leong *et al.*, 2006). L'attivazione di HER-2, che avviene in seguito ad un'autofosforilazione a livello dei residui di tirosina, induce una serie di complessi segnali intracellulari per la crescita, la differenziazione e la sopravvivenza delle cellule (Vijapurkar *et al.*, 2003; Casalini e Iorio, 2004). In condizioni normali, quando al recettore proteico di membrana HER-2 si legano i fattori di crescita, la cellula è stimolata nella sua crescita e divisione. In diversi tumori sono riscontrabili mutazioni o espressioni patologiche del recettore. La proteina recettoriale mutata lancia continui segnali mitotici alle cellule, anche in assenza del fattore di crescita. La sovraespressione del recettore, che è più comune della mutazione, fa sì che le cellule cancerose abbiano una risposta esagerata in presenza di normali livelli di fattori di crescita (Robbins *et al.*, 2003).

L'alterazione del gene HER-2, seconda, come frequenza, solamente alla mutazione del gene p53 (Thomson *et al.*, 2001; De Maria *et al.*, 2005) è riportata in diverse neoplasie umane (tumori mammari, polmonari, vescicali, gastrici e ovarici) e quasi sempre prevede un'amplificazione del gene stesso con una duplicazione di una particolare sequenza genica, una aumentata trascrizione dell'mRNA e una sovraespressione della glicoproteina transmembranaria (Tubbs *et al.*, 2001; Millanta *et al.*, 2005). La sovraespressione di HER-2 determina una stimolazione della crescita cellulare (Leong *et al.*, 2006), un potenziamento della motilità delle cellule tumorali in associazione alla riorganizzazione del citoscheletro di actina, alla secrezione di proteasi e all'invasione (Leong *et al.*, 2006). Essa determina inoltre stimolazione della linfoangiogenesi (attraverso la sovraespressione di VEGF-C, vascular endothelial growth factor-C) e stimolazione della diffusione metastatica (stimolando la sovraespressione di angiopoietina2) (Carter e Niu, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Infine si può osservare una alterazione del funzionamento dei punti di controllo del ciclo cellulare, della riparazione del DNA e delle risposte apoptotiche (Eccles, 2004).

L'espressione di HER-2 ha, in oncologia umana, un significato prognostico. Nella donna infatti il riscontro di un'amplificazione genica e/o di una sovraespressione di HER-2 è associato a una prognosi sfavorevole (Leong *et al.*, 2006), con una sopravvivenza minore (Tawfik *et al.*, 2006), un breve intervallo libero da malattia (Eccles, 2004), un aumentato rischio di metastasi (Eccles,

2004) e una elevata aggressività clinica del tumore (De Maria *et al.*, 2005). Inoltre l'espressione di HER-2 ha un significato terapeutico testimoniato dal fatto che, per quanto ancora controverso, tumori che presentano una sovraespressione di HER-2 rispondono in maniera insufficiente alla terapia ormonale (resistenza al tamoxifene anche in pazienti con tumori positivi per i recettori degli estrogeni) e ai protocolli chemioterapici standard (De Maria *et al.*, 2005). In medicina umana viene effettuata una selezione dei pazienti da sottoporre a trattamento farmaceutico, approvato nel settembre 1998 dalla FDA (Food and drug administration), che si basa sull'utilizzo di un anticorpo monoclonale HER-2 specifico somministrato per via endovenosa (Herceptin®, Trastuzumab) in grado di bloccare HER-2 e di prevenire quindi la crescita delle cellule cancerose. La selezione dei pazienti viene effettuata valutando con indagine immunohistochimica l'espressione di HER-2 che viene quantificata sulla base di un sistema di punteggio standardizzato e certificato in medicina umana (HercepTest, DAKO). Recentemente si è tuttavia notato che la maggior parte delle pazienti che inizialmente rispondono a Herceptin, generalmente nel giro di un anno acquistano un certo grado di resistenza. I meccanismi alla base di questa resistenza sono ad oggi oggetto di discussione (Dieras *et al.*, 2007).

Il ruolo di HER-2 in carcinomi mammari canini e in linee cellulari è indagato utilizzando tecniche di ibridazione in situ e indagini immunohistochimiche. Questi studi suggeriscono che l'amplificazione di questo gene abbia una frequenza simile a quella che si riscontra nella donna e per questo si ritiene possa avere un ruolo nello sviluppo mammario tumorale maligno nella cagna e quindi anche un significato prognostico (Millanta *et al.*, 2005).

Nel gatto la sovraespressione di HER-2 nel tessuto mammario è stata studiata solo recentemente. Un solo studio fino ad ora ha identificato il gene felino HER-2 evidenziando notevoli similitudini tra le sequenze dei recettori tirosin chinasi della stessa famiglia nella donna, nel cane e nel gatto (De Maria *et al.*, 2005). I meccanismi che intervengono nella regolazione della sovraespressione della proteina Her-2 nei carcinomi mammari felini (FMC) sono ad oggi oggetto di dibattito (De Maria *et al.*, 2005). I dati disponibili riguardo alla sovraespressione della proteina HER-2 felina nei tumori mammari presentano spiccata variabilità nei lavori fino ad oggi effettuati (da 39% a 90% dei tumori) (De Maria *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005; Winston *et al.*, 2005). Va sottolineato che in questi lavori le percentuali di positività sono più alte di quelle che si riscontrano in medicina umana dove le neoplasie che risultano HER-2 positive sono circa il 30%.

1.10 Il p53 e i tumori mammari

Il gene p53 è un oncosoppressore che codifica per un fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare. Il gene umano è collocato sul cromosoma 17. E' stato individuato e mappato anche in altri animali, tra cui il cane, dove è localizzato sul cromosoma 5. Condizioni di stress di diverso tipo come anossia, espressione inappropriata di oncogeni e danno all'integrità del DNA possono portare a un'attivazione del gene p53. Il prodotto della sua attivazione è in grado di indurre l'arresto del ciclo cellulare in fase G1, di indurre la riparazione del DNA, di regolare la produzione di proteine che comunicano i segnali di stress alle cellule adiacenti, di inibire l'angiogenesi (Dameron *et al.*, 1994; Nasir *et al.*, 1999; Robbins *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2006). Se in seguito all'arresto del ciclo cellulare la riparazione del DNA viene effettuata con successo il p53 favorisce la trascrizione (up-regulation) del gene MDM2 (murine double minute-2), che a sua volta determina una down-regulation del p53 stesso (meccanismo di feedback negativo), sbloccando la cellula che può rientrare nel ciclo. Se la riparazione del DNA durante la pausa non viene portata a compimento il gene p53 dirotta la cellula verso l'apoptosi inducendo il gene BAX che favorisce nei mitocondri il rilascio di citocromo C e quindi promuove la cascata delle caspasi che porta appunto all'apoptosi.

L'alterata funzionalità della proteina p53 può essere determinata da numerose cause ma nella maggior parte dei casi si ha una mutazione del DNA (Moll *et al.*, 1992; Nasir *et al.*, 1999; Robbins *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2005). Uno studio ha evidenziato che nell'uomo la maggior parte delle mutazioni al gene p53 si determinano un'alterazione nel dominio centrale della proteina (residui 102-292) che contiene la sequenza specifica che consente il legame col DNA (Cho *et al.*, 1994). Per quanto riguarda la sequenza amminoacidica del gene p53 felino è simile per l'82.1% a quella umana e ha caratteristiche strutturali in comune col gene p53 di parecchie altre specie (Okuda *et al.*, 1994). Uno studio del 2000 effettuato su 60 tumori felini ha evidenziato la presenza di mutazioni comprese tra l'esone 4 e l'esone 8 del gene p53: in particolare mutazioni missenso in due fibrosarcomi, un istiocitoma fibroso maligno, un carcinoma indifferenziato della cute e in un carcinoma mammario; una mutazione non senso in un fibrosarcoma; una delezione in un carcinoma squamoso (Mayr *et al.*, 2000). Recenti studi in medicina umana hanno evidenziato che la mutazione al gene p53 produce proteine mutate che, non solo non sono in grado di svolgere adeguatamente la funzione oncosoppressiva, ma svolgono anche direttamente un ruolo oncogeno (andando ad attivare

la trascrizione di promotori di geni coinvolti nel ciclo cellulare) (Scian *et al.*, 2004).

L'interesse per il gene p53 deriva dal fatto che questo è il gene più frequentemente mutato (50%) nei casi di tumore maligno nell'uomo (tra cui quelli al colon, al polmone, alla mammella, allo stomaco, al rene e al fegato). Nel gatto i tumori in cui si è riscontrata una mutazione al gene p53 sono osteosarcomi, fibrosarcomi, sarcomi a cellule fusate, sarcomi pleomorfi e carcinomi a cellule squamose (Nasir *et al.*, 1999; Dobson & Morris, 2001; Nakano *et al.*, 2005). Sebbene la maggior parte degli studi fatti nel gatto abbia preso in considerazione un numero limitato di tumori e solo alcune tipologie, questi dati, assieme all'alto livello di omologia riscontrato tra le sequenze di DNA del gene P53 umano e felino, suggeriscono un possibile ruolo di p53 nel meccanismo di carcinogenesi di entrambe le specie (Nasir *et al.*, 1999).

Normalmente nelle cellule non stressate la proteina p53 è rapidamente degradata (tempo di emivita di 20 minuti) grazie alla MDM2. Se il gene p53 è mutato, la proteina inattiva che ne deriva non è in grado di indurre l'espressione della proteina MDM2 con conseguente accumulo della p53 mutata nel nucleo cellulare. L'indagine immunohistochimica (IHC) è una delle metodiche che vengono impiegate per evidenziare tale accumulo. (Nakano *et al.*, 2005). La rilevazione immunohistochimica della proteina p53 è considerata pertanto un metodo indiretto per l'identificazione di una mutazione al gene p53. Tuttavia, sebbene la correlazione tra l'espressione proteica rilevabile con l'IHC e la mutazione del gene sia elevata, grosse delezioni o mutazioni "stop" premature sono in grado di impedire la produzione della proteina conferendo risultati negativi all'IHC. Questo tipo di aberrazioni genetiche sono state riscontrate frequentemente negli osteosarcomi umani. Inoltre mutazioni che modificano la conformazione della proteina possono far sì che l'anticorpo primario non riesca a riconoscere l'antigene, generando ancora falsi negativi (Nasir *et al.*, 1999).

L'analisi a livello proteico pare offrire parecchi vantaggi rispetto agli studi effettuati direttamente sul gene p53. Gli studi che si concentrano sulla mutazione sono infatti spesso limitati agli esoni 5 e 8 del gene e non considerano regioni promotrici ed enhancer col rischio di sottostimare la frequenza di mutazione del gene stesso. In aggiunta, come già detto, la mutazione è la modalità più frequente con la quale si ha l'inattivazione funzionale della p53, ma non è l'unica (Nasir *et al.*, 1999). La percentuale di cellule positive in tumori mammari felini viene descritta in quattro lavori che utilizzano tuttavia diversi sistemi di punteggio per la valutazione semiquantitativa della espressione della proteina, rendendo difficoltosa la comparazione dei risultati ottenuti (Nasir *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2007).

1.11 Il Ki-67 nei tumori mammari

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. L'espressione della proteina Ki67, indagata mediante tecniche immunostochimiche, è stata oggetto di numerosi studi volti a valutare eventuali relazioni esistenti tra la proliferazione cellulare neoplastica e gli aspetti morfologici, clinico-prognostici e molecolari. In medicina veterinaria è di uso comune per tali lavori l'impiego di un anticorpo monoclonale (MIB-1), specifico per la proteina umana, caratterizzato da una buona cross-reattività nelle specie domestiche (Webster *et al.*, 2007). La positività per l'antigene Ki-67 è nucleare (diffusa o granulare) e le figure mitotiche, se presenti, sono sempre notevolmente evidenziate.

Alcuni autori hanno indagato la valenza dell'espressione di tale antigene in termini prognostici nel tumore mammario felino (Castagnaro *et al.*, 1998; Millanta *et al.*, 2002). I risultati ottenuti in merito a quello che viene denominato indice Ki-67 o indice MIB-1 (percentuale di nuclei positivi valutata alla periferia della lesione, su 1000 cellule esaminate, in almeno 10 campi differenti) nei FMC hanno evidenziato alcune controversie. Per alcuni autori l'indice MIB-1 è apparso aumentare progressivamente passando da forme iperplastico/benigne a forma maligne aggressive, ad eccezione delle forme di FMH (iperplasia mammaria felina) che non hanno manifestato differenza significativa con i carcinomi invasivi. In aggiunta, tale indice è risultato essere correlato positivamente con l'invasione dei vasi linfatici (Millanta *et al.*, 2002) e negativamente con l'espressione dei recettori per gli estrogeni (Millanta *et al.*, 2006). Altri studi hanno evidenziato una mancanza di correlazione dell'indice MIB-1 con il tipo istologico (Castagnaro *et al.*, 1998; Millanta *et al.*, 2002), il grado istologico (Millanta *et al.*, 2002) e la dimensione del tumore (Millanta *et al.*, 2002). Dati controversi sono emersi, in particolare, per quanto riguarda l'eventuale correlazione con la sopravvivenza. Una chiara associazione tra sopravvivenza ad un anno dall'intervento chirurgico e indice Ki-67 è stata evidenziata nello studio di Castagnaro e colleghi (1998) che, considerando un valore cut-off dell'indice Ki-67 pari a 25,2% ha

messo in evidenza che al di sopra di tale valore il 12,5% dei gatti dopo un anno sono ancora vivi e l'87,5% sono morti e al di sotto di esso la situazione si capovolge (Castagnaro *et al.*, 1998). Un lavoro più recente non ha invece confermato una correlazione statisticamente significativa tra tempo di sopravvivenza e indice MIB-1 elevato (\geq alla mediana che è 18,7%) in un gruppo di 48 gatte con carcinoma mammario invasivo. Lo stesso studio ha tuttavia notato che i soggetti con indice MIB-1 maggiore di 22 hanno una prognosi più sfavorevole (Millanta *et al.*, 2002). I dati riportati appaiono relativamente esigui e contraddittori, pertanto ulteriori studi dovrebbero essere svolti per verificare se l'indice Ki-67 sia significativamente utilizzabile nella pratica clinica come fattore prognostico per i FMC, eventualmente valutando le relazioni esistenti con altri indici proliferativi quali l'indice mitotico AgNORs e la conta dei PCNA (Castagnaro *et al.*, 1998; Millanta *et al.*, 2002). Si consideri, infatti, che nella donna l'espressione di Ki-67 è considerata un fattore prognostico per la sopravvivenza e la recrudescenza della lesione e viene per questo utilizzata per discriminare sottogruppi prognostici nel cancro al seno precoce con linfonodo negativo (Traut *et al.*, 2002; Urriticoechea *et al.*, 2005).

1.12 “Ritratto” del tumore mammario

La recente ricerca sul carcinoma mammario nella donna si propone, sulla base degli aspetti morfologici delle neoplasie e di altri fattori predittivi indagati tramite esami immunohistochimici (IHC), studi di micro-array e studi di amplificazione genica e sequenziamento, di delineare un “ritratto” delle lesioni che possa essere correlato con la prognosi. (Fausto *et al.*, 2005). In particolare gli sviluppi nel campo della ricerca negli ultimi anni consentono l'utilizzo di nuove tecnologie in grado di determinare profili di espressione molecolare/genica con possibilità di identificare i tumori mammari secondo diverse classi molecolari, verificandone quindi l'eventuale differenza dal punto di vista biologico/di evoluzione o sviluppo (Pusztai *et al.*, 2006).

Tra i principali fattori predittivi si distinguono: l'espressione dei recettori per gli estrogeni e per il progesterone (ER e PR) che è indicativa della validità di un'eventuale terapia ormonale; l'espressione dell'oncogene HER-2, valutata per l'eventuale impiego di una terapia anticorpale anti HER-2; l'espressione di molecole indicatrici di proliferazione cellulare (quali Ki67 e PCNA); l'espressione di molecole indicative dell'origine della cellula neoplastica quali i filamenti intermedi come le cheratine (proteine che organizzano i tonofilamenti delle cellule epiteliali), la vimentina (proteina che si trova nei tessuti connettivi e in altre cellule di origine non epiteliale), la desmina (proteina che si trova nelle cellule muscolari) e i microfilamenti (ASMA, alpha smooth muscle actin); l'espressione di oncoproteine (myc); l'espressione di proteine implicate nella regolazione dell'apoptosi (Bcl-2); l'espressione di proteine ad azione oncosoppressiva (p53, Maspin); l'evidenziazione di mutazioni geniche (BRCA1, BRCA2).

In medicina umana attraverso indagini di micro-array si possono classificare i carcinomi mammari secondo classi di espressione molecolare. I carcinomi mammari nella donna vengono pertanto suddivisi in carcinomi positivi all'espressione del recettore per gli estrogeni (ER) e in carcinomi negativi all'ER. Tra quest'ultimi si possono distinguere i carcinomi positivi all'espressione dell'oncogene HER-2 (epidermal grow factor receptor 2) e i carcinomi HER-2 negativi. I carcinomi HER-2 negativi presentano principalmente un profilo di espressione dei filamenti intermedi citoplasmatici che viene definito “basal like” (Signoretti *et al.*, 2002). Quante e quali classi di tumori sia possibile evidenziare alla luce dei dati ad oggi disponibili è oggetto di studio e di dibattito (Perou *et al.*, 2000; Pusztai *et al.*, 2006). Dalla distinzione di questi tipi tumorali derivano importanti informazioni utili dal punto di vista prognostico e terapeutico.

Nel 60-80% delle donne il carcinoma mammario sovraesprime ER ed è pertanto possibile

utilizzare, in questi casi, un approccio terapeutico basato su agenti ormonali, quali ad esempio gli inibitori delle aromatasi, o il Tamoxifene. Il 20-40% dei tumori sovraesprime HER-2; in questi casi la terapia si basa sull'utilizzo di un anticorpo monoclonale (Herceptin) in grado di bloccare i recettori HER-2. Il 10-15% delle neoplasie risulta negativa all'espressione di ER, PR e di HER-2 e la maggior parte è caratterizzata da un comportamento biologico aggressivo e da un profilo molecolare definito "basal like" in quanto è caratterizzata dall'espressione di molecole che sono normalmente espresse in cellule basali/mioepiteliali normali quali le citocheratine basali ad alto peso molecolare (CK14, CK5/6, CK17), vimentina, alfa-B ctistallina, p-caderina, fascina, caveolina A e caveolina B. (Reis-Filho *et al.*, 2008). Tali neoplasie risultano generalmente molto aggressive, con prognosi sfavorevole e ad oggi non esiste per esse un approccio terapeutico specifico. In generale i carcinomi che sono negativi per ER (HER-2 positivi e carcinomi "basal like") hanno una prognosi peggiore di quelli positivi per ER (Dalgin *et al.*, 2007).

2. SCOPO

Il presente lavoro si propone di:

- caratterizzare dal punto di vista morfologico e attraverso indagini immunostochimiche le neoplasie mammarie feline evidenziando l'eventuale presenza di specifiche classi, categorie o gruppi tumorali;
- evidenziare eventuali associazioni tra le i risultati immunostochimici, le categorie individuate, le caratteristiche morfologiche e i dati clinico-anamnestici;
- ottenere informazioni istogenetiche e prognostiche attualmente scarse in letteratura;
- definire la valenza del tumore mammario felino come modello per lo studio del tumore al seno nella donna.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Tessuti esaminati

In questo studio vengono utilizzati 81 campioni di tessuto mammario fissati in formalina spediti da numerose cliniche veterinarie del Centro-Nord Italia tra il 2002 e il 2006 al Servizio Diagnostico di Anatomia Patologica Veterinaria del Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia comparata ed Igiene Veterinaria della Facoltà di Veterinaria dell'Università di Padova. I tessuti fissati in formalina sono accompagnati da moduli per la raccolta dei dati anamnestici riferiti all'animale su cui è stato effettuato il prelievo.

I campioni di tessuto conservati in formalina per almeno 48 ore sono stati successivamente inclusi in paraffina mediante processatore automatico (Alessandrini ® Embed 503). Sezioni di 4µm effettuate con microtomo (LEICA® RM 2145) sono state successivamente colorate con ematossilina ed eosina secondo procedure standard. In questo modo è stato possibile effettuare esame istologico e il grading delle neoplasie.

3.2 Classificazione delle lesioni e grading

La valutazione istologica dei campioni è stata effettuata seguendo le linee guida della classificazione dei tumori mammari proposta dalla WHO (Misdorp *et al.*, 1999). Alcune classi morfologiche descritte in letteratura unicamente per il cane sono state riconosciute nei tessuti di gatto esaminati e quindi utilizzate. Alcune lesioni a morfologia atipica sarebbero dovute rientrare nei “tumori non classificati”, tuttavia, considerandone il dettaglio morfologico specifico, si è preferito introdurre classi morfologiche “nuove” (ad esempio il mioepitelioma maligno).

Di seguito è riportata in particolare la “Nuova Classificazione” elaborata in questo lavoro per definire i vari tipi di tumore mammario. Relativamente ad alcune voci dello schema è indicato il sistema di classificazione di origine, mentre per quelle il cui nome è stato elaborato durante il lavoro non compare ovviamente nessuna classificazione di appartenenza.

CLASSIFICAZIONE RIELABORATA DEL TUMORE MAMMARIO FELINO

1 LESIONI MALIGNHE

- Carcinoma in situ: lesione con nessuna evidenza di infiltrazione e che comunque non fa presupporre un comportamento infiltrante (è detto comedonico se presenta lobuli solidi con necrosi centrale) (dalla classificazione WHO del gatto).

- Carcinoma duttale: lesione che è caratterizzata da formazioni simil-cordonali e papillifere irregolari in cui è possibile rilevare occasionalmente la presenza di due file di cellule: basali e luminali. Spesso è presente differenziazione squamosa. Alle volte si osserva iperplasia delle cellule mioepiteliali per cui la lesione presenta una componente epiteliale maligna e una mioepiteliali iperplastica, pertanto tale categoria include anche il carcinoma complesso.

- Carcinoma semplice: lesione composta da un solo tipo cellulare, epiteliale luminale o mioepiteliale. A seconda delle caratteristiche che il tumore presenta può essere indicato col termine:
 - Carcinoma tubulopapillare (dalla classificazione WHO del gatto)
 - Carcinoma tubulare (comedonico se mostra un aspetto lobulare solido con necrosi centrale) (dalla classificazione WHO del gatto)
 - Carcinoma papillare (dalla classificazione WHO del gatto)
 - Carcinoma cistopapillare (dalla classificazione WHO del gatto)
 - Carcinoma solido (comedonico se mostra un aspetto lobulare solido con necrosi centrale) (dalla classificazione WHO del gatto)
 - Carcinoma tubulosolido
 - Carcinoma cribriforme (dalla classificazione WHO del gatto).

- Tipi speciali di carcinoma:
 - Carcinoma a cellule squamose (Carcinoma adenosquamoso se sono presenti in maggioranza strutture tubulari) (dalla classificazione WHO del gatto)
 - Carcinoma mucinoso (dalla classificazione WHO del gatto)
 - Carcinoma ricco in lipidi (dalla classificazione WHO del cane)
 - Carcinoma a cellule fusate (dalla classificazione WHO del cane).
 - Carcinosarcoma (dalla classificazione WHO del gatto).

- Carcinoma o sarcoma in tumore misto benigno (dalla classificazione WHO del gatto)

- Sarcoma (fibrosarcomi, osteosarcomi e altri) (dalla classificazione WHO del cane).

2 LESIONI BENIGNE

- Adenoma semplice (dalla classificazione WHO del gatto).

- Adenoma duttale: con proliferazione epiteliale e mioepiteliale (dalla classificazione WHO

- Fibroadenoma: ad alta o bassa cellularità (detto cambiamento fibroadenomatoso se associato a trattamenti ormonali) (dalla classificazione WHO del gatto).

- Tumore misto benigno (dalla classificazione WHO del gatto).

- Adenoma papillare (dalla classificazione WHO del gatto).

3.TUMORI NON CLASSIFICATI

4.DISPLASIE/IPERPLASIE MAMMARIE

- Iperplasia duttale: (papillomatosi): iperplasia epiteliale papillifera intraduttale (dalla classificazione WHO del gatto).

- Adenosi: (iperplasia lobulare): aumento numerico dei duttuli e degli alveoli (dalla classificazione WHO del gatto).

- Epiteliosi: iperplasia epiteliale intraluminale dei dotti intralobulari (dalla classificazione WHO del gatto).

- Cisti: (dalla classificazione WHO del gatto).

- Ectasia duttale: (dalla classificazione WHO del gatto).

- Fibrosclerosi: (dalla classificazione WHO del gatto).

Il grading delle neoplasie maligne senza metastasi o emboli metastatici è stato effettuato secondo il sistema di punteggio descritto nell'introduzione (capitolo 1.3).

3.3 Indagine immunoistochimica

Le indagini immunoistochimiche sono state effettuate su sezioni di 4µm di spessore su vetrini portaoggetti Superfrost® utilizzando un immunocoloratore automatico BenchMark® (Ventana Medical System). L'immunocoloratore utilizza le indagini alla temperatura di 40 °C ed utilizza come sistema di rivelazione l'*ultraView™ Universal DAB*, un nuovo sistema di rivelazione *biotina-free* basato sull'utilizzo di un multimeri complessato all'enzima perossidasi *Horse-raddish* che permette di identificare in modo sensibile gli anticorpi primari di topo e coniglio. Questo kit comprende cinque componenti: *ultraView™ Universal DAB Inhibitor* (che impedisce un'aspecifica perossidazione della DAB), *ultraView™ Universal DAB HRP Multimer* (multimero 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*. Tutte le fasi dell'indagine sono effettuate in associazione alla presenza di una soluzione oleosa che ricopre il vetrino creando una camera umida. Per ogni vetrino vengono dispensati in modo automatico o manualmente 100 microlitri di soluzione contenente l'anticorpo primario a diluizioni specifiche per ciascuna molecola indagata. I reagenti sono continuamente miscelati e mantenuti al di sotto della copertura oleosa da flussi di aria orientati su ogni vetrino. La controcolorazione viene effettuata con ematossilina di Mayer per 4 minuti. Al termine della corsa di reazione i vetrini vengono lavati accuratamente con acqua corrente e sapone per asportare la soluzione oleosa. Vengono poi disidratati attraverso vari passaggi da due minuti in soluzioni crescenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100%) e infine di xilene. Infine le sezioni vengono montate tramite EUKITT.

Gli anticorpi e i le fasi principali dei protocolli impiegati per le indagini immunoistochimiche

dei preparati vengono riassunti nella tabella 8.

Marcatore molecolare	Anticorpo	Diluizione*	Fasi del protocollo	
			smascheramento	Tempo di incubazione**
citocheratina 5/6	Cytokeratin 5/6	1:100	CCR	24 min
	Clone D5/16 B4 (Mo)		+	
	Dakocytomation		enzima per 2 min	
Citocheratina 14	Cytokeratin 14	1:20	CCR	18 min
	NCL -L-LL002 (Mo)			
	Novo castra			
Citocheratina 8/18	Cytokeratin 8/18	1:20	Enzima per 8 min	24 min
	NCL-L-5D3 (Mo)			
	Dakocytomation			
Pancitocheratine	Mouse anti-human cytokeratin	1:100	CCR	16 min
	Clone AE1/AE3 (Mo)			
	Dakocytomation			
Calponina	Mouse anti-human calponin	1:200	CCR	12 min
	Clone Calp (Mo)			
	Dakocytomation			
Vimentina	Mouse anti-vimentin	1:100	CCR	18 min
	Clone V9 (Mo)			
	Dakocytomation			
α actina muscolare liscia	Anti-human Smooth Muscle Actin	1:100	nessuno	10 min
	Clone 1A4 (Mo)			
	Dakocytomation			
Recettore estrogeni	Mouse anti-human estrogen receptor	1:40	CCS	14 min
	NCL-ER-6F11 (Mo)			
	Novocastra			
Recettore progesterone	Anti-human progesterone receptor	1:100	CCE	18 min
	Clone: PR10A9 (Mo)			
	Immunotech			
HER-2	Rabbit anti-human	1:250	CCR	18 min
	c-erbB-2 Oncoprotein (Pol)			
	Dakocytomation			
P53	Anti-human p53 protein	1:550	CCS	12 min
	Clone: NCL-p53-CM1 (Pol)			
	Novocastra			

Marcatore molecolare	Anticorpo	Diluizione*	Fasi del protocollo	
			smascheramento	Tempo di incubazione**
Ki67	Anti-human Ki67 Antigen Clone MIB-1 (Mo) Dakocytomation	1:100	CCR	10 min

Tabella 8: nella tabella vengono descritte le fasi principali dei protocolli immunostochimici. CCR, cell conditioning ridotto: 30 minuti a 95° C; CCS, cell conditioning standard: 60 minuti a 95° C; CCE, cell conditioning esteso: 90 minuti a 95° C; *l'anticorpo primario è diluito in Antibody Diluent (Ventana); **tempo di incubazione dell'anticorpo primario

Per ciascun caso i controlli negativi sono stati ottenuti sostituendo la soluzione con anticorpo primario con 100 microlitri di diluente utilizzato per gli anticorpi (antibody diluent, Ventana). In tabella 9 sono indicati, per ciascun anticorpo, i controlli positivi indicativi della venuta reazione.

Anticorpo	Controllo positivo
Cytokeratin 5/6 Clone D5/16 B4 (Mo)	Strati basali e medi della cute
Cytokeratin 14 NCL -L-LL002 (Mo)	Cute
Cytokeratin 8/18 NCL-L-5D3 (Mo)	Epitelio luminale delle ghiandole sudoripare apocrine
Mouse anti-human cytokeratin Clone AE1/AE3 (Mo)	Cute
Mouse anti-human calponin Clone Calp (Mo)	Miofibroblasti e muscolatura liscia vasale
Mouse anti-vimentin Clone V9 (Mo)	Fibroblasti
Anti-human Smooth Muscle Actin Clone 1A4 (Mo)	Miofibroblasti e muscolatura liscia vasale
Mouse anti-human estrogen receptor NCL-ER-6F11 (Mo)	Sezione di utero di gatto
Anti-human progesterone receptor Clone: PR10A9 (Mo)	Sezioni di utero di gatto
Rabbit anti-human c-erbB-2 Oncoprotein (Pol)	Sezioni di tumore mammario con punteggio di 3 all'Herept test
Anti-human p53 protein Clone: NCL-p53-CM1 (Pol)	Sezioni di carcinomi squamosi cutanei felini
Anti-human Ki67 Antigen Clone MIB-1 (Mo)	Infiltrati linfocitari e follicoli piliferi (controllo interno)

Tabella 9: nella tabella vengono indicati i tessuti utilizzati come controllo positivo per i marcatori molecolari.

3.4 Valutazione della positività dei tessuti

Le valutazioni delle positività dei tessuti ai singoli anticorpi sono state effettuate al microscopio ottico (Microscopio Olympus BX41) considerando separatamente lesioni maligne, neoplasie benigne, displasie, tessuto ghiandolare sano e emboli neoplastici intravascolari o metastasi linfonodali, quando presenti nel medesimo campione analizzato.

La positività dei tessuti all'anticorpo anti-recettore alfa degli estrogeni e all'anticorpo anti-recettore del progesterone è stata valutata determinata attraverso l'evidenziazione della reazione colorimetrica a livello del nucleo delle cellule. Per ogni campione sono state contate 1000 cellule in almeno 10 campi microscopici a 40X esprimendo poi in percentuale il numero di cellule che risultavano positive rispetto al totale di cellule contate. Le lesioni con valori di positività inferiori al 5% sono state considerate negative sia per il recettore del progesterone che per il recettore degli estrogeni.

La valutazione della positività citoplasmatica delle cellule agli anticorpi anti-citocheratine 5/6, anti-8/18, anti-pancitocheratine, anti-vimentina, anti-calponina e anti-alfa-sma è stata effettuata per ogni campione contando 1000 cellule in almeno 10 campi microscopici a 40X. Per tali anticorpi si è inoltre valutato se la positività fosse relativa alle cellule mioepiteliali, alle cellule basali o alle cellule luminali e se le cellule positive presentassero una specifica morfologia.

La positività per l'anticorpo anti-HER-2 è stata valutata osservando la colorazione brunastra delle membrane cellulari. A questo scopo si sono contate su almeno 10 campi microscopici all'obbiettivo 40X, 100 cellule per campo, per un totale di 1000 cellule. Si è identificata la colorazione di membrana come completa o parziale e come intensa o lieve-moderata e il sistema di punteggio che è stato impiegato è quello oggi utilizzato routinariamente in medicina umana nell'ambito dell'Hercep Test (vedi Tabella 10).

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

Tabella 10: sistema di attribuzione del punteggio relativo all'espressione di HER-2 valutata con tecnica IHC, Hercep Test, DAKO.

I casi con un punteggio 0 o 1+ sono considerati negativi, i casi con un punteggio 2+ sono considerati debolmente positivi, i casi con un punteggio 3+ sono considerati fortemente positivi. Studi molto recenti ritengono tuttavia che il punteggio 2+ dovrebbe essere considerato come uno "status indeterminato" perché è un punteggio che ha dimostrato una scarsa concordanza con i dati derivati da indagini effettuate tramite ibridazione in situ fluorescente (FISH), con un rischio di falsi positivi dal 6 al 50%. Per questo in medicina umana oggi si consiglia che i casi cui è attribuito un punteggio 2+ con l'IHC, siano considerati equivoci e quindi vengano automaticamente sottoposti alla FISH (Leong *et al.*, 2006).

La valutazione della positività per p53 è stata fatta utilizzando il microscopio ottico e andando a quantificare la percentuale di cellule tumorali che presentavano i nuclei di colorazione brunastra. A questo scopo si sono contate su almeno 10 campi microscopici all'obbiettivo 40X, 100 cellule per un totale di 1000 cellule. Il valore è stato poi espresso con metodica semi-quantitativa utilizzando il sistema di punteggio già impiegato da Nasir e collaboratori nel 1999 che prevede una suddivisione in categorie come evidenziato in tabella 11.

	Punteggio
0% di cellule positive	0
Meno del 5% di cellule tumorali positive	1
Tra 5% e 25% di cellule tumorali positive	2
Tra 26% e 50% di cellule tumorali positive	3

Tabella 11: sistema di punteggio impiegato per la valutazione della positività alla p53 tumori mammari felini adottata da Nasir e collaboratori (Nasir *et al.*, 1999).

La valutazione della positività per il ki67 è stata fatta utilizzando il microscopio ottico e andando a quantificare la percentuale di cellule tumorali che presentavano i nuclei positivi (indice Ki-67 o indice MIB-1). A questo scopo si sono contate su almeno 10 campi microscopici all'obbiettivo 40X, 100 cellule per un totale di 1000 cellule.

3.5 Raccolta informazioni di follow up

La raccolta dei dati di *follow up* è stata effettuata tramite la compilazione di un apposito questionario da parte dei veterinari delle strutture che avevano inviato i campioni e/o tramite intervista eseguita per via telefonica.

3.6 Analisi Statistiche

Le analisi statistiche relative ai risultati di positività e intensità delle valutazioni immunoistochimiche in relazione alle tipologie istologiche e ad alcuni dati anamnestici e di follow-up sono state effettuate mediante l'utilizzo dei test non parametrici quali test della correlazione di Spearman, Test di Kruskal-Wallis, test di Mann Whitney, test di Wilcoxon e test di Wilcoxon per campioni appaiati. Il limite di significatività dei test è stato fissato per $P \leq 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Dati anamnestici

I dati anamnestici che si riferiscono agli 81 gatti di cui sono state raccolte le lesioni nel presente lavoro, riguardano l'età degli animali, la razza, il sesso (l'eventuale sterilizzazione e l'età a cui è stata effettuata), l'intervallo di tempo tra la comparsa della lesione e la prima visita veterinaria, la localizzazione e le dimensioni delle lesioni (tabella 12). Dal momento che, forse per una scarsa attenzione nella compilazione delle schede anamnestiche da parte delle strutture veterinarie che hanno inviato i campioni, molte informazioni sono andate perdute, i valori medi dei diversi parametri di seguito evidenziati sono relativi al gruppo di soggetti per i quali i dati erano disponibili.

Tabella 12: elenco dei casi presi in esame con le relative informazioni anamnestiche. Legenda: "aa": anni, "f": femmina intera, "fc": femmina sterilizzata, "fnd": femmina, ma non si sa se sterilizzata o meno", "fc, aa": femmina sterilizzata ad una età nota espressa in anni, "mc": maschio castrato, "Macro": descrizione macroscopica della lesione fornita dal veterinario, "Comparsa": intervallo di tempo dalla comparsa della lesione, "scon.": informazione sconosciuta, "sx": sinistra, "dx": destra.

Caso	Razza	Età (aa)	Sesso	Macro	Sede (mammella e lato)	Comparsa
1	Soriano	10	fc,2 aa	5X4X0,5cm	3 sx	15 gg
2	Birmano	11	fc,8 aa	3cm	3 sx	15 gg
3	comune europeo	15	f	due noduli di 3 cm circa	3 -4 dx e sx	120 gg
4	Siamese	10	fc	5mm	4 dx	scon.
5	comune europeo	12	fc	1cm	2 sx	30 gg
6	comune europeo	14	fc,14 aa	3cm	3 sx	195 gg
7	comune europeo	12	fc,12 aa	4,5X2,5X0,8cm	2 sx e dx	1825 gg
8	comune europeo	11	fc,1 aa	pochi mm (recidiva)	4 sx e dx	365 gg
9	Persiano	14	f	4X3cm	2 sx	scon.
10	comune europeo	16	f	6-8cm	3 e 4	scon.
11	comune europeo	11	fc,11 aa	2cm	4 dx	30 gg
12	comune europeo	13	fc,3 aa	3cm/1cm	2 dx e 3-4 sx	365 gg
13	comune europeo	14	fnd	2mm	4sx	scon.
14	comune europeo	12	f	2-3mm	3 e 4	scon.
15	scon.	11	f	0,5cm	3 e 4	2 gg
16	comune europeo	10	fc,7 aa	0,4X0,3Xcm	2 sx	180 gg
17	comune europeo	14	fc	scon.	4 sx	scon.
18	comune europeo	8	f	1cm	2 e 3 sx	scon.
19	comune europeo	11	fc	2-3mmX2-3mm	3e 4 sx	scon.
20	Persiano	13	fc,10 aa	nodulo dimensioni noce	3 dx	scon.
21	comune europeo	13	fnd	3X4cm	3 dx	scon.
22	comune europeo	6	fc	nodulo di circa 3cm	Sx	scon.
23	comune europeo	10	fc	scon.	scon.	scon.

Caso	Razza	Età (aa)	Sesso	Macro	Sede (mammella e lato)	Comparsa
24	comune europeo	12	f	5cm	1	scon.
25	comune europeo	13	fc	Biopsia	scon.	scon.
26	Siamese	15	fc	Nodulo	scon.	scon.
27	comune europeo	12	fc	noduli multipli	Sx	scon.
28	Persiano	2	f	Nodulo	scon.	scon.
29	Persiano	11	f	noduli multipli	Dx	scon.
30	comune europeo	10	fc	scon.	dx e sx	scon.
31	scon.	16	f	Nodulo	scon.	scon.
32	scon.	12	fc	2cm	scon.	scon.
33	comune europeo	9	fc	0,7X0,5cm	scon.	scon.
34	scon.	8	f	5mm	Sx	scon.
35	comune europeo	14	f	Nodulo	1 sx	scon.
36	comune europeo	10	fc	Nodulo	Sx	scon.
37	comune europeo	12	fc	1X3,5cm	scon.	scon.
38	Persiano	12	f	2,5cm	scon.	scon.
39	comune europeo	11	f	2,5cm	scon.	scon.
40	comune europeo	11	fc	1,5cm	scon.	scon.
41	comune europeo	15	fc	noduli multipli di 1,5cm	scon.	scon.
42	scon.	scon.	f	Nodulo	Sx	scon.
43	comune europeo	15	fc	noduli multipli di 3mm	3 sx	scon.
44	Persiano	5	f	1cm	scon.	scon.
45	comune europeo	16	fc	noduli multipli di 2cm	scon.	scon.
46	comune europeo	12	fc	noduli multipli	scon.	scon.
47	comune europeo	10	f	Nodulo	scon.	scon.
48	scon.	scon.	f	Nodulo	4 sx	scon.
49	comune europeo	10	f	Biopsia	scon.	scon.
50	Siamese	scon.	fc	5mm	Dx	scon.
51	comune europeo	12	fc	un nodulo	2 sx	scon.
52	scon.	scon.	fc	un nodulo	Dx	scon.
53	Persiano	16	f	un nodulo	4 dx	scon.
54	comune europeo	13	fc	noduli multipli	Sx	scon.
55	comune europeo	15	fc	scon.	scon.	scon.
56	comune europeo	7	f	Nodulo	scon.	scon.
57	scon.	1	f	scon.	scon.	scon.
58	comune europeo	12	fc	un nodulo	1 e 2 dx	scon.
59	comune europeo	12	f	un nodulo	4	scon.
60	comune europeo	10	f	6cm	4	scon.
61	comune europeo	15	f	1cm	Dx	scon.
62	comune europeo	11	fc	3cm	scon.	scon.
63	comune europeo	10	f	4mm	2	scon.
64	comune europeo	10	f	2cm	1 dx	scon.
65	Persiano	9	fc	noduli multipli di 5mm	Sx	scon.
66	comune europeo	11	fnd	noduli multipli di 1,5-2cm	4 sx	scon.
67	comune europeo	8	f	3X3cm	scon.	scon.
68	comune europeo	11	fc	scon.	scon.	scon.
69	comune europeo	11	f	un nodulo	2	scon.
70	comune europeo	14	fc	un nodulo	1 sx	scon.
71	Persiano	6	f	un nodulo	scon.	scon.
72	comune europeo	15	f	noduli multipli	3 e 4	scon.
73	Persiano	11	fc	1,5cm	3 dx	scon.
74	comune europeo	17	f	metastasi linfonodale	Linfonodo	scon.

Caso	Razza	Età (aa)	Sesso	Macro	Sede (mammella e lato)	Comparsa
75	comune europeo	13	fc	scon.	scon.	scon.
76	comune europeo	8	fc	noduli multipli	3 dx	scon.
77	comune europeo	14	fc	4cm	scon.	scon.
78	Siamese	16	fc	un nodulo	4 dx	scon.
79	scon.	13	f	noduli multipli	1 sx	scon.
80	comune europeo	17	f	noduli multipli	sx e dx	scon.
81	comune europeo	15	fc,10 aa	4cm	4 sx	scon.

Gli 81 gatti esaminati sono tutti femmine. L'età dei soggetti della popolazione varia da 1 anno (caso n. 57) a 17 anni (casi n. 74 e 80) con un valore medio di 11,65 anni. Non si evidenziano sostanziali differenze nell'età media dei soggetti che presentano lesioni neoplastiche maligne (12 anni) e benigne (11,5 anni). La razza più rappresentata nella popolazione è il "Comune europeo" (56 soggetti su 72 soggetti di cui la razza è conosciuta, 77,7 %); i restanti soggetti sono 10 gatti "Persiani", 4 "Siamesi", un "Soriano" e un "Birmano". Di 9 soggetti invece non si conosce la razza. L'età media dei soggetti di razza "Siamese" è di 14 anni. Le gatte sterilizzate sono il 58,7% (47 su 80). Purtroppo abbiamo informazioni sull'età di sterilizzazione solo per 10 soggetti. Per questi 10, l'età media alla quale è stato eseguito l'intervento è di 7,8 anni (*range* da 1 a 12 anni).

Le masse asportate sono localizzate prevalentemente alla terza (15 casi su 54) e alla quarta mammella (19 casi su 54) e generalmente risulta più colpita la linea mammaria di sinistra (31 casi su 54) rispetto a quella di destra (20 casi su 54). Per 26 soggetti non è stata indicata la sede precisa della lesione. Le descrizioni macroscopiche delle lesioni, essendo spesso approssimative e poco uniformi tra loro, non ci hanno permesso di fare delle valutazioni medie; tuttavia si è notato che in 14 casi il veterinario curante ha segnalato la presenza di noduli multipli. Solo per 12 casi abbiamo a disposizione la data riferita dal proprietario di comparsa della massa/e. Per quanto riguarda questo dato si riscontra una notevole variabilità: l'intervallo di tempo che è intercorso da quando il proprietario si è accorto della lesione a quando ha portato l'animale al veterinario curante, varia da un paio di giorni (caso n. 15) fino a 5 anni (caso n. 7), con un valore medio di 8,7 mesi.

4.2 Indagini istologiche

In Appendice I vengono descritte le lesioni istologiche riscontrate nei casi analizzati in associazione al grading e ai risultati di positività ottenuti per i singoli anticorpi. In appendice II sono raccolte le fotografie relative alle lesioni istologiche più rappresentative e alle indagini immunoistochimiche.

L'analisi istopatologica dei campioni ha permesso di evidenziare 159 lesioni di cui 76 maligne, 9 benigne e 74 lesioni iperplastiche/displastiche. Le lesioni maligne più frequentemente riscontrate sono state il carcinoma tubulare (22 casi), il carcinoma tubulopapillare (16 casi) e il carcinoma tubulosolido (9 casi); seguono il carcinoma comedonico (6 casi), il carcinoma cribriforme (2 casi), il carcinoma solido (2 casi), il carcinoma tubulare (2 casi), il carcinoma a cellule squamose (3 casi, di cui uno localizzato a livello del capezzolo), il carcinoma in adenoma papillare (1 caso), il carcinoma in situ (1 caso), il carcinoma cistopapillare (1 caso), il carcinoma papillare (1 caso). In due casi il tumore maligno ha evidenziato due patterns morfologici distinti: il caso 39 è stato descritto morfologicamente come carcinoma tubulopapillare e comedonico, il caso numero 72 è risultato essere un carcinoma tubulare e duttale. Tra le lesioni maligne si sono evidenziate anche 9 metastasi linfonodali e una metastasi polmonare. Una delle 9 metastasi linfonodali era l'unica lesione istologicamente evidenziata (caso 74). In 23 tumori maligni è stato attribuito un *grading* pari a 2, in 17 un *grading* pari a 1 e in 8 un *grading* pari a 3; inoltre in 9 neoplasie maligne (4 carcinomi tubulopapillari, 3 carcinomi con pattern tubulosolido e 2 carcinomi tubulari) si è osservata anche la presenza di emboli all'interno dei vasi linfatici. In solo due neoplasie la presenza di emboli vascolari alla periferia della lesione primaria era associata a metastasi linfonodali.

Il tumore benigno che più frequentemente si è riscontrato è l'adenoma duttale (6 casi); seguono il fibroadenoma (2 casi) e l'adenoma papillare (1 caso). In 7 casi è stata fatta una diagnosi istopatologica che ha dimostrato la concomitante presenza di 2 diversi tumori. Di questi, 5 hanno evidenziato due forme maligne e 1 ha mostrato una forma benigna e una maligna. In un caso si è individuata la presenza di un carcinoma squamoso del capezzolo associato ad un fibroadenoma (caso n. 44).

Le lesioni iperplastiche/displastiche più frequentemente evidenziate sono l'ectasia duttale

(28 casi), l'iperplasia lobulare (30 casi) e l'iperplasia duttale (15 casi). Si è riscontrata invece in una sola sezione l'epiteliosi (caso n. 72). Le lesioni non neoplastiche sono le uniche presenti in 12 casi, mentre sono associate a lesioni tumorali in 31 casi. Per 9 soggetti è stato possibile anche valutare la presenza di tessuto ghiandolare sano incluso in sezione.

In 29 casi si è osservato, in associazione alla lesione primaria maligna, la presenza di una lesione iperplastica. In nove casi invece si osservava la presenza, per il medesimo campione di una lesione iperplastica associata ad una lesione displastica.

4.3 Indagini immunoistochimiche

I risultati delle indagini immunoistochimiche del presente lavoro sono riassunte in Appendice I.

Il pattern di espressione di ciascuna delle molecole indagate nelle lesioni esaminate è stato definito "Atteso" per le lesioni iperplastico/displastiche quando si è evidenziata ripetitività nella positività di alcune componenti cellulari che ha rispecchiato quanto si osserva nella normalità.

La positività per l'anticorpo anti-pancitocheratine è stata considerata "attesa" quando si è evidenziata in tutto l'epitelio (cellule epiteliali luminali, epiteliali basali e mioepiteliali). La totalità delle lesioni (benigne, maligne, iperplastiche, displastiche) è risultata essere positiva alle pancitocheratine. Si è evidenziata però una lesione metastatica di carcinoma solido (caso 31) con una positività solamente nel 31,7% delle cellule neoplastiche.

Per la α -sma-actina e la calponina il pattern "atteso" è coinciso con la positività a carico dei miofibroblasti e delle cellule basali appiattite riferibili a cellule mioepiteliali. Le lesioni iperplastico/displastiche si sono rivelate sempre "attese" sia per la calponina che per la α -sma-actina. Nel caso della calponina le neoplasie sono risultate sempre negative, ad eccezione di un caso (campione 8, 1,6% di cellule positive). Nei casi di fibroadenoma, di adenoma duttale, di carcinoma duttale e di carcinoma complesso la componente cellulare costituita dalle cellule mioepiteliali si è dimostrata positiva sia alla calponina che alla alfa-sma-actina.. In solo tre carcinomi le cellule mioepiteliali alla periferia della proliferazione neoplastica, evidenziate con calponina e alfa-sma e

distinte dai miofibroblasti tramite citocheratina 14, costituivano uno strato continuo, mentre in tutti gli altri carcinomi tale strato di cellule appariva discontinuo. Un carcinoma che era stato descritto come “in situ” all’esame istopatologico ha evidenziato invece l’assenza dello strato di elementi mioepiteliali alla periferia (caso 4). Si è evidenziato inoltre che l’incompletezza dello strato di cellule mioepiteliali caratterizzava anche lesioni benigne quali l’adenoma duttale (casi 55, 56, 70) e la lesione descritta all’indagine istologica come epiteliosi (caso 72). Infine la calponina e la alfa-sma hanno dato la possibilità di evidenziare in due casi, caso 7 e caso 60, che all’indagine istologica avevano evidenziato la presenza di una popolazione neoplastica epiteliale maligna, la concomitante proliferazione di elementi mioepiteliali con caratteri di malignità. Tale popolazione ha inoltre manifestato una positività per citocheratine 5/6 e 14.

Nel caso della vimentina il pattern “Atteso” ha indicato, oltre alla positività di fibroblasti e miofibroblasti, una diffusa positività basale/mioepiteliali, una positività luminale da multifocale a diffusa a livello dei dotti interlobulari (ectasici e normali), e una positività multifocale luminale a livello di siti iperplastici degli stessi dotti. Tutte le lesioni iperplastiche/displastiche sono risultate “Attese” ad eccezione dell’epiteliosi che è risultata negativa. Solamente quattro carcinomi (casi 8, 33, 34 e 52) sono risultati negativi alla vimentina mentre tutti gli altri, il 93,9% dei carcinomi, sono risultati positivi con una media di espressione del 67,7%. Tra questi solamente tre carcinomi erano caratterizzati da una positività inferiore al 10% delle cellule.

Per quanto riguarda le valutazioni immunohistochimiche dell’espressione della citocheratina 5/6 si segnala che problemi tecnici determinati dalla terminazione dei campioni e dal decadimento dell’anticorpo utilizzato non hanno permesso la valutazione su tutti i campioni esaminati. Per la citocheratina 5/6 il pattern “atteso” si è riferito sia alla positività delle cellule disposte in monostato che costituivano il distretto basale a livello dei dotti sia alla mancanza di una positività a livello acinare. Quarantatre delle 44 lesioni iperplastiche/displastiche per le quali è stato possibile effettuare l’indagine immunohistochimica hanno evidenziato un pattern “atteso” di espressione e in due casi su 43 (casi 27 e 28) si è evidenziata in aggiunta una positività a carico delle cellule luminali nei dotti interlobulari. Nel caso 30 l’ectasia duttale ha evidenziato una positività discontinua a carico dello strato basale. In tutte le lesioni neoplastiche benigne si è osservata una positività diffusa delle cellule mioepiteliali (iperplastiche e non), mentre le cellule epiteliali luminali sono sempre risultate negative. Dei 42 carcinomi per cui è stata valutata l’espressione della

citocheratine 5/6, 14 sono risultati negativi, 20 hanno evidenziato una positività con valori variabili da 0,5% al 68% in cellule localizzate sia a livello basale che a livello luminale che potevano presentare una morfologia di tipo squamoso, mentre in un unico caso, il carcinoma squamoso del capezzolo (caso 44), si è evidenziata una positività del 100%. Nei rimanenti 7 carcinomi (casi numero 7, 16, 41, 52, 60, e i due carcinomi del caso 65) la citocheratina 5/6 non ha marcato la popolazione maligna evidenziata all'indagine istologica ma ha marcato il 100% delle cellule che costituivano la proliferazione di una seconda popolazione cellulare, mioepiteliale, non evidenziata all'indagine istologica, che ha mostrato positività anche a calponina, alfa-sma-actina e citocheratina 14. Per due carcinomi tale popolazione presentava inoltre caratteristiche di malignità (casi 7 e 60). In tutti i carcinomi esaminati, le cellule che presentavano una morfologia caratterizzata da ampie vacuolizzazioni citoplasmatiche sono risultate negative alla citocheratina 5/6, alla calponina, alla citocheratina 14 e alla citocheratine 8/18 mentre sono risultate comunque positive alla pancitocheratina. In un caso (caso 20) si è evidenziata invece una netta differenza tra le cellule neoplastiche positive alla citocheratine 5/6, localizzate esclusivamente a livello basale, e le cellule positive alla citocheratine 14 localizzate sia a livello basale e luminale. Su 15 carcinomi di grado 1 di cui erano disponibili i dati di espressione della citocheratina 5/6, 12 erano caratterizzati da una percentuale di espressione pari a 0 e 1 da una percentuale di espressione pari a 0,5% (rare cellule positive). Gli altri due carcinomi esprimevano percentuali di positività pari a 5,4% e 56,2%. La media di espressione della citocheratina 5/6 per i carcinomi di grado 1 era del 4,4%, per i carcinomi di grado 2 era del 8,1%, per i carcinomi di grado 3 era del 33,5%.

Il pattern di espressione della citocheratine 8/18 è stato considerato "Atteso" quando si è osservata positività più o meno intensa degli elementi epiteliali luminali e quando cellule luminali appiattite dei grossi dotti sono risultate invece negative. La positività della colorazione è stata inoltre descritta, per le lesioni neoplastiche, come + in caso di intensità lieve, come ++ in caso di intensità moderata, e come +++ in caso di intensità marcata. Tutte le lesioni iperplastiche e displastiche hanno evidenziato un pattern di espressione "Atteso". L'epiteliosi (caso 72) ha invece mostrato una positività del 100% delle cellule, con marcata intensità. Nelle lesioni yumorali benigne il 100% delle cellule luminali è risultato positivo. Tra i carcinomi gli unici due casi in cui la citocheratine 8/18 è risultata negativa sono stati il carcinoma squamoso del capezzolo (caso 44) e un carcinoma tubulosolido (caso 66). Tutti gli altri carcinomi sono risultati positivi all'espressione della citocheratina 8/18 con 42 casi su 66 (63,5%) caratterizzati dal 100% di positività della

popolazione neoplastica e con 60 casi su 66 (91%) con una percentuale comunque superiore al 60%. In tutti i carcinomi la positività alla citocheratina 8/18 era caratterizzata da un progressivo aumento di intensità verso il lume della proliferazione.

La citocheratina 14 è stata descritta come “Attesa” quando non si è evidenziata alcuna reazione a livello basale nelle strutture acinari e quando invece si è osservato un distretto di elementi epiteliali basali positivi a livello dei dotti. Nel 90,5% delle lesioni iperplastiche/displastiche il pattern di espressione è risultato atteso. In 3 ectasie duttali, due iperplasie duttali, 1 iperplasia lobulare e nell’unico caso di epiteliosi la citocheratine 14 è risultata negativa. I casi 21 e 75 presentavano ciascuno due lesioni displastiche/iperplastiche che sono risultate entrambe negative. Nei tumori benigni si è osservata esclusivamente la positività della popolazione mioepiteliale. Per quanto riguarda i dati di espressione dei carcinomi si è osservato, per quelli di grado 1, una percentuale di positività pari al 23,4%, per quelli di grado 2 una percentuale del 39,3% e per quelli di grado 3 una percentuale del 36,5%. La positività dei carcinomi appariva inoltre più intensa per le cellule localizzate a livello basale rispetto alle cellule in posizione più luminale. Sia a carico delle lesioni tumorali che delle lesioni iperplastico/displastiche, occasionalmente si sono osservate aree di positività multifocale che interessavano entrambi gli strati epiteliali basale e luminale, con cellule dalla forma chiaramente poligonale, con abbondante citoplasma eosinofilo e di aspetto simil-squamoso. Frequentemente a carico di lobuli iperplastici era possibile evidenziare la presenza di dotti caratterizzati da epitelio luminale marcatamente positivo alla citocheratina 14. Spesso tali dotti erano evidenziabili in lobuli iperplastici localizzati alla periferia di lesioni neoplastiche maligne. All’interno del carcinoma tubulare del campione 14 sono state riscontrate due diverse componenti cellulari: la prima tubulare associata alla presenza di matrice fibrillare all’interno del lume, la seconda sempre tubulare ma non associata a tale matrice. Inoltre erano presenti aree con secrezione mucinosa. Su questo campione sono state quindi eseguite tre diverse colorazioni volte ad individuare la natura della matrice. Con la tricromica di Masson la matrice fibrillare ha assunto colorazione blu ed è stata quindi identificata come collagene. All’alcian blue (pH 2,6) sono risultate positive le aree di secrezione mucinosa, mentre la PAS ha colorato secreto e mucina. Nel medesimo campione era presente anche adenosi in cui si è rilevata positività alla CK14 da parte dei dotti intralobulari.

L’indagine immunoistochimica per la valutazione dell’espressione dei recettori ormonali ha

evidenziato, per il recettore alfa degli estrogeni, una positività maggiore del 5% per il 4,68% delle neoplasie maligne mentre per quanto riguarda il recettore del progesterone solamente due carcinomi, uno tubulare e uno tubulopapillare (rispettivamente casi 7 e 15) sono risultati positivi (3,12% delle lesioni neoplastiche maligne). Tra i carcinomi risultati positivi al recettore degli estrogeni distinguiamo 2 carcinomi tubulopapillari, un carcinoma papillare e un carcinoma in adenoma duttale. Tutte le lesioni metastatiche sono risultate negative all'indagine di entrambi i recettori ormonali così come gli emboli evidenziati a livello dei vasi alla periferia delle lesioni maligne. Delle 9 neoplasie benigne, 4 hanno evidenziato una percentuale di positività al recettore degli estrogeni superiore al 5%, una inferiore al 5% (4% di cellule positive) e 4 sono risultate negative. Per il recettore del progesterone invece solo due lesioni neoplastiche benigne hanno evidenziato una positività superiore al 5%, due inferiore al 5% e 4 sono risultate negative. Solamente in un fibroadenoma (caso 44) si è osservata una concomitante espressione di recettore per gli estrogeni e per il progesterone superiore al 5%. La media di espressione del recettore degli estrogeni nei carcinomi è risultata pari al 2,9%, nelle neoplasie benigne pari all'8,4% e nelle lesioni iperplastiche/displastiche è risultata del 10,4%. Il recettore del progesterone ha invece evidenziato una media di espressione di 7,86% nelle lesioni iperplastiche/displastiche, di 7,08% nelle lesioni neoplastiche benigne e di 1,5% nei carcinomi. Per quanto riguarda l'espressione del recettore degli estrogeni nei campioni di ghiandola mammaria sana (9 casi totali), solamente due casi sono risultati negativi mentre per gli altri campioni la positività è variata dallo 0,5% al 70% con una media di espressione del 43%. Per quanto riguarda l'espressione del progesterone nei campioni di tessuto ghiandolare sano si è evidenziata la mancanza di positività in quattro casi. Gli altri campioni sono risultati positivi con una media di espressione di 38,7% mentre la media di espressione del recettore del progesterone per tutti i campioni di tessuto sano era del 21,5%. Un unico campione di tessuto sano (caso numero 11) è risultato negativo sia all'estrogeno che al progesterone. In tutte le analisi, le sezioni di utero di gatto, usate come controllo positivo, ha costantemente manifestato un risultato positivo sia per il recettore del progesterone che per il recettore degli estrogeni.

L'indagine immunohistochimica per la valutazione dell'espressione di HER-2 ha permesso di evidenziare una positività in 4 delle 76 lesioni maligne (5,2%). In particolare in due metastasi linfonodali si è attribuito un punteggio 2+ (casi n. 31 e 62), e un punteggio 3+ è stato invece attribuito ad un carcinoma tubulare (caso n. 11) e ad un carcinoma a cellule squamose del capezzolo (caso 44). Sono invece risultate negative tutte le altre 72 forme maligne di cui 66 con punteggio 0 e

6 con punteggio 1+. Alcuni tumori maligni, come ad esempio i carcinomi dei casi numero 3 e numero 61, sono risultati negativi alla valutazione per l'HER-2 ma presentavano aree con pattern di positività diversa: alcune descrivibili con un punteggio 3+ ed altre con meno del 10% di cellule positive. L'unico tumore benigno risultato positivo (punteggio 2+) è stato il fibroadenoma del caso 44 che era associato al carcinoma squamoso del capezzolo, risultato anch'esso positivo con il punteggio 2+. Sono invece negative tutte le altre forme benigne delle quali 6 con punteggio 0 e 2 con punteggio 1+. Il 5,4% delle 74 lesioni iperplastiche/displastiche è risultato positivo: il caso 76 ha evidenziato un punteggio 2+ per l'ectasia duttale e per l'iperplasia duttale mentre hanno evidenziato un punteggio 3+ l'ectasia duttale del caso numero 30 e l'iperplasia duttale nel caso 79. Sono invece negative le altre 67 lesioni non neoplastiche, di cui 61 con punteggio 0 e 6 con punteggio 1+. Si segnala infine che nel caso numero 11 i dotti interlobulari presenti alla periferia del nodulo di carcinoma tubulare sono risultati positivi a P53, hanno evidenziato un indice MIB-1 pari a 12% e sono risultati chiaramente positivi anche per HER-2 con punteggio 3+. Anche il carcinoma tubulare era caratterizzato dalla triplice positività (punteggio 3+ per HER-2, categoria 2 per p53 e indice MIB-1 uguale a 23,9%). La triplice positività è stata inoltre evidenziata anche per la metastasi linfonodale del caso numero 61 (punteggio 2+ per HER-2, categoria 3 per P53 e indice MIB-1 pari a 37,8%). Sia il caso 11 che il 61 sono infine risultati negativi al recettore per gli estrogeni e per il progesterone. In tutte le analisi, il carcinoma mammario umano, usato come controllo positivo, ha costantemente manifestato un risultato positivo.

Per quanto riguarda la P53, il 12% delle lesioni maligne è risultato positivo. Dei casi positivi uno è rientrato nella categoria 1 (caso numero 33), 4 sono rientrati nella categoria 2 (un carcinoma tubulare, caso numero 11; un carcinoma tubulosolido associato a emboli intravascolari anch'essi positivi, caso numero 62 e due metastasi, casi 61 e 74), 3 sono rientrati in categoria 3 (2 carcinomi tubulopapillari, casi 61 e 69 e una metastasi linfonodale, caso 62) e un caso di carcinoma tubulopapillare è rientrato in categoria 4 (caso 59). Quest'ultimo caso era associato all'unica lesione iperplastica (iperplasia duttale), localizzata alla periferia della neoplasia maligna, risultata positiva (Categoria 3). Nel caso numero 11 si sono osservati, alla periferia del carcinoma tubulare, alcuni dotti interlobulari a morfologia apparentemente normali che hanno però evidenziato una spiccata espressione di p53. In tutte le analisi, i due carcinomi squamosi cutanei, utilizzati come controlli positivi, hanno costantemente manifestato una positività nucleare di intensità.

Per quanto riguarda Ki-67, le lesioni maligne hanno presentato un indice proliferativo MIB-1 medio pari a 29,8% (range da 0 a 49,3%). Le lesioni benigne hanno manifestato una minore attività proliferativa rispetto alle maligne, con un indice MIB-1 medio pari a 7,5% (range da 3,8 a 18,6%). Le lesioni iperplastiche/displastiche hanno dimostrato mediamente di avere una frazione di cellule ciclanti ancora minore (ectasia duttale 3,8%, iperplasia duttale 9,3%, iperplasia lobulare 8,6%). Il tessuto sano ha confermato la sua bassa frazione di cellule in crescita dato che l'indice MIB-1 medio è risultato pari a 0,4% (range da 0 a 2). In tutte le analisi, gli infiltrati linfocitari e/o i follicoli piliferi presenti in sezione, utilizzati come controlli positivi interni, hanno costantemente manifestato una netta positività.

4.4 Valutazioni statistiche

I risultati delle indagini statistiche vengono riassunti in tabella 13, 14 e 15. La valutazione dei risultati di espressione di p53 effettuata con test della Correlazione di Spearman (tabella 13) è stata effettuata sia per valori espressi in percentuale che per categoria. Per le categorie impiegati si veda la tabella 11 al capitolo 3.4 Valutazione della positività dei tessuti.

			p53	p53 (classe)	Ki67	HER-2	PR	ER	VIM	CK14	CK8/18	CK5/6	
Spearman's rho	p53	Correlation Coefficient	1.000										
		Sig. (2-tailed)	.										
		N	153										
p53	p53	Correlation Coefficient	1.000(**)	1.000									
		Sig. (2-tailed)	.000	.									
		N	152	152									
ki67	ki67	Correlation Coefficient	.270(**)	.270(**)	1.000								
		Sig. (2-tailed)	.001	.001	.								
		N	153	152	153								
her2	her2	Correlation Coefficient	.081	.080	-.009	1.000							
		Sig. (2-tailed)	.323	.330	.917	.							
		N	151	150	151	154							
PR	PR	Correlation Coefficient	-.128	-.126	-.328(**)	-.084	1.000						
		Sig. (2-tailed)	.130	.136	.000	.321	.						
		N	142	141	142	140	142						
ER	ER	Correlation Coefficient	-.165	-.167(*)	-.418(**)	-.013	.195(*)	1.000					
		Sig. (2-tailed)	.051	.050	.000	.884	.022	.					
		N	140	139	140	138	138	140					
VIM	VIM	Correlation Coefficient	-.253(*)	-.250(*)	.225	.002	-.285(*)	-.052	1.000				
		Sig. (2-tailed)	.031	.033	.055	.986	.020	.677	.				
		N	73	73	73	73	66	67	74				
CK14	CK14	Correlation Coefficient	-.126	-.125	.503(**)	.056	-.476(**)	-.399(**)	.125	1.000			
		Sig. (2-tailed)	.291	.295	.000	.638	.000	.001	.318	.			
		N	72	72	72	72	64	63	66	73			
CK8_18	CK8_18	Correlation Coefficient	-.133	-.136	-.269(*)	-.015	.204	.235	-.097	-.094	1.000		
		Sig. (2-tailed)	.265	.255	.022	.902	.101	.056	.425	.464	.		
		N	72	72	72	71	66	67	70	63	72		
CK5_6	CK5_6	Correlation Coefficient	-.142	-.142	.350	-.037	-.272	-.259	.063	.617(**)	-.267	1.000	
		Sig. (2-tailed)	.453	.453	.058	.846	.162	.175	.742	.000	.161	.	
		N	30	30	30	30	28	29	30	30	29	31	

** Evidenziati in verde: correlazione significativa con P < 0.01. * Evidenziati in giallo: correlazione significativa con P < 0.05.

Tabella 13. Risultati delle valutazioni statistiche effettuate mediante test della Correlazione di Spearman su alcuni immunomarcatori analizzati in tutte le lesioni istologiche riscontrate nello studio.

		p53	p53 classe	ki67	HER-2	PR	ER	VIM	CK14	CK8/18	CK5/6	ETA'	Grading
p53	Pearson Correlation	1.000											
	Sig. (2-tailed)	.											
	N	54											
p53	Pearson Correlation	1.000(**)	1.000										
	Sig. (2-tailed)	.000	.										
	N	54	54										
ki67	Pearson Correlation	.285(*)	.283(*)	1.000									
	Sig. (2-tailed)	.036	.038	.									
	N	54	54	54									
her2	Pearson Correlation	.024	.027	-.014	1.000								
	Sig. (2-tailed)	.863	.846	.919	.								
	N	53	53	53	54								
PR	Pearson Correlation	-.102	-.102	-.481(**)	-.135	1.000							
	Sig. (2-tailed)	.464	.464	.000	.334	.							
	N	54	54	54	53	54							
ER	Pearson Correlation	-.132	-.132	-.388(**)	-.029	.212	1.000						
	Sig. (2-tailed)	.340	.340	.004	.839	.124	.						
	N	54	54	54	53	54	54						
VIM	Pearson Correlation	-.177	-.175	.268	.039	-.208	.007	1.000					
	Sig. (2-tailed)	.210	.214	.055	.786	.138	.959	.					
	N	52	52	52	52	52	52	53					
CK 14	Pearson Correlation	-.173	-.175	.298(*)	.043	-.324(*)	-.262	.070	1.000				
	Sig. (2-tailed)	.255	.251	.046	.779	.030	.082	.646	.				
	N	45	45	45	45	45	45	46	46				
CK 8/18	Pearson Correlation	-.179	-.182	-.312(*)	.056	.203	.264	-.094	-.145	1.000			
	Sig. (2-tailed)	.196	.189	.022	.693	.141	.054	.509	.343	.			
	N	54	54	54	53	54	54	52	45	54			
CK 5/6	Pearson Correlation	-.165	-.165	.351	-.151	-.296	-.205	-.030	.624(**)	-.167	1.000		
	Sig. (2-tailed)	.452	.452	.101	.492	.170	.348	.888	.001	.446	.		
	N	23	23	23	23	23	23	24	24	23	24		
età	Pearson Correlation	-.050	-.050	.192	.105	-.200	-.141	.299(*)	-.205	.186	-.328	1.000	
	Sig. (2-tailed)	.733	.733	.186	.478	.168	.333	.039	.198	.202	.127	.	
	N	49	49	49	48	49	49	48	41	49	23	49	
gradi ng	Pearson Correlation	.161	.161	.318	-.117	-.190	-.454(*)	.125	.229	-.082	.250	-.087	1.000
	Sig. (2-tailed)	.388	.388	.082	.531	.306	.010	.504	.241	.662	.370	.655	.
	N	31	31	31	31	31	31	31	28	31	15	29	32

** Evidenziati in verde: correlazione significativa con $P < 0.01$.

* Evidenziati in giallo: correlazione significativa con $P < 0.05$.

Tabella 14. Risultati delle valutazioni statistiche effettuate mediante test della Correlazione di Spearman su alcuni immunomarcatori analizzati nei tumori (esclusi emboli e metastasi) riscontrati nello studio.

Diagnosi morfologica	Ki-67	ER	PR
TM/Met/TB/D/TS*	P<0.01	P<0.01	P<0.01
TM/met°	Ns	ns	ns
TM/TB°	TM>TB (P<0.01)	TM<TB (ns)	TM<TB (P<0.01)
TM/D°	TM>D (P<0.01)	TM<D (P<0.01)	TM<D (P<0.01)
TM/TS°	TM>TS (P<0.01)	TM<TS (P<0.01)	TM<TS (P<0.01)
met/TB°	met>TB (P<0.01)	met<TB (P<0.05)	met<TB (P<0.01)
met/D°	met>D (P<0.01)	met<D (P<0.05)	met<D (P<0.05)
met/TS°	met>TS (P<0.01)	met<TS (P<0.01)	met<TS (P<0.01)
TB/D°	Ns	ns	ns
TB/TS°	TB>TS (P<0.05)	ns	ns
D/TS°	D>TS (P<0.01)	D<TS (P<0.01)	D<TS (P<0.05)

Tabella 15. Differenze di espressione tra categorie morfologiche valutate mediante test di Kruskal Wallis* e Mann-Whitney° per alcuni marcatori, analizzati in tutte le lesioni istologiche evidenziate nello studio (valori di significatività). TM: tumore maligno; Met: metastasi/embolo; TB: tumore benigno, D: displasia/iperplasia; TS: tessuto sano

Analizzando le differenze di espressione per Ki67, ER, PR, her-2 e p53, tra tumori maligni e displasia/iperplasie in soggetti appaiati mediante test di Wilcoxon per campioni appaiati, la differenza di espressione si è mantenuta significativa rispettivamente per Ki67 (P<0.01) maggiormente espresso nel tessuto maligno e per ER maggiormente espresso nel tessuto iperplastico (P<0.05) (dati non presentati).

I risultati delle valutazioni statistiche effettuate mediante test di Mann-Whitney per valutare le differenze dell'espressione di alcuni immunomarcatori (Ki-67, ER, PR, Her-2, p53, CK14, CK8/18, CK5/6) nei tumori (esclusi emboli e metastasi) evidenziati nello studio in relazione alla sopravvivenza dei soggetti intesa come sopravvivenza maggiore o minore di un anno e allo sviluppo di metastasi/emboli vascolari, hanno messo in evidenza una differenza statisticamente significativa (P<0.05) per l'espressione di Ki-67, risultato rispettivamente più alto nei soggetti deceduti entro l'anno e in quelli che hanno sviluppato metastasi o emboli vascolari (dati non presentati). In aggiunta nei soggetti che non hanno manifestato metastasi si è rilevata una espressione più alta di CK14 (P<0.05). Ancora, nelle gatte sopravvissute meno di un anno si osserva una maggior espressione di CK5/6 per quanto non statisticamente significativa (P=0.08). Relativamente alle differenze di espressione tra soggetti sterilizzati e non sterilizzati si è evidenziato un unico valore significativo rappresentato dalla CK8/18 apparentemente maggiormente espressa nei soggetti sterilizzati (P<0.05).

5. DISCUSSIONE

Le 81 gatte oggetto di studio nel presente lavoro hanno presentato proliferazioni nodulari singole o multiple a carico della ghiandola mammaria. In accordo con quanto riportato in letteratura (Dobson & Morris, 2001) l'età media dei soggetti che hanno presentato almeno una lesione neoplastica è di 12 anni (range da 5 a 17 anni). La razza "Comune Europeo" è la più rappresentata, ma tale incidenza potrebbe essere dovuta più alla notevole diffusione di questi soggetti che ad una reale predisposizione di tale razza allo sviluppo di neoplasie mammarie. I gatti "Siamesi" colpiti da lesione neoplastica, per quanto rappresentati da soli 4 soggetti, sono caratterizzati da un range di età tra i 10 e 16. Tale dato non suggerisce una predisposizione per i gatti siamesi allo sviluppo di neoplasie mammarie in età più giovane come riportato da alcuni autori (Misdorp, 2002).

Al momento della diagnosi 44 gatte su 81 (54,3%) erano sterilizzate e, per 10 casi, dei quali era conosciuta l'età di sterilizzazione, si è visto che questa corrispondeva mediamente a 7,8 anni. I 10 soggetti hanno sviluppato noduli mammari e nessuno di essi era stato sterilizzato entro l'intervallo di tempo consigliato per ottenere un effetto protettivo (6 mesi-1 anno) (Overley *et al.*, 2005).

Mediamente le gatte prese in esame sono state portate alla prima visita veterinaria, per la comparsa di lesioni mammarie, 8,7 mesi dopo l'evidenziazione delle lesioni da parte del proprietario. Come descritto in letteratura i proprietari si accorgono delle lesioni nei loro animali molto prima rispetto a quando decidono di richiedere un intervento medico (Couto & Nelson, 2003). Nei 55 soggetti di cui conosciamo la sede di localizzazione della lesione, sono più colpite la terza e la quarta mammella in accordo con i dati riportati in letteratura (Dobson & Morris, 2001).

L'87,3% degli animali a cui è stata diagnosticata, sulla base dell'indagine istopatologica, una lesione tumorale ha evidenziato una neoplasia maligna e ciò conferma i dati d'incidenza della letteratura che riportano una percentuale di incidenza delle neoplasie maligne che va dall'80 al 96% (Castagnaro *et al.*, 1998). Il carcinoma semplice, rappresentato da diversi tipi istologici, è stata la neoplasia maligna con prevalenza maggiore, a riprova che questa neoplasia è quella maggiormente frequente nella specie felina (Misdorp, 2002).

L'evidenziazione dell'espressione della vimentina a carico delle cellule epiteliali luminali nei dotti normali ed ectasici della ghiandola mammaria nel gatto differisce da quanto si osserva

nella donna dove la vimentina è espressa, nella ghiandola sana nelle cellule mioepiteliali (Daabs, 2007). L'elevata percentuale di carcinomi che esprimono la vimentina (93,9%) e l'elevata percentuale di espressione nella popolazione cellulare in ciascuna delle lesioni maligne evidenziate in questo lavoro, si discostano molto da quanto succede nella donna dove la frequenza dei tumori positivi alla vimentina è molto più bassa (intorno al 10%) e anche la percentuale di cellule positive in ciascuna lesione è comunque inferiore al 10% (Dabbs, 2007). I valori di espressione della vimentina nei carcinomi felini sono invece più simili a quelli dei carcinomi "basal like" nella donna (Livasy *et al.*, 2006; Lerma *et al.*, 2007).

L'utilizzo di anticorpi anti-calponina, anti-alfa-sma e anti-citokeratina 14 ha potuto evidenziare che, nei carcinomi, il monostrato di cellule mioepiteliali che dovrebbe separare la popolazione neoplastica dal rimanente parenchima ghiandolare risulta incompleto. In oncologia umana l'evidenziazione di uno strato continuo di cellule mioepiteliali permette di distinguere le lesioni neoplastiche in situ da quelle infiltranti (Dabbs, 2007). Se questo valesse anche per i carcinomi nel gatto si spiegherebbe l'aggressività e la malignità che caratterizzano tale neoplasia. I tre anticorpi prima considerati hanno dato la possibilità di distinguere inoltre, in due casi che erano stati definiti come carcinomi all'indagine istopatologica, una seconda popolazione cellulare con spiccate caratteristiche di malignità di origine mioepiteliale. Per quanto il limitato numero di casi e gli scarsi dati di follow-up non abbiano permesso di stabilire una correlazione con la prognosi, il dato evidenziato risulta interessante per il fatto che una doppia nomenclatura che descriva un carcinoma ed un mioepitelioma maligno in un singolo nodulo non è contemplata nella classificazione WHO.

Per quanto riguarda i dati sulla positività all'espressione del recettore alfa degli estrogeni dei tumori mammari di gatto, i dati riportati in letteratura, secondo i quali la maggior parte dei tumori maligni risulta negativa, trovano riscontro nel presente lavoro che evidenzia infatti una percentuale di carcinomi positivi pari solamente al 4,68% delle lesioni maligne (Hahn *et al.*, 1994; De las Mulas *et al.*, 2000). La mancanza di espressione del recettore nelle metastasi e il concomitante risultato negativo anche a livello di nodulo primario suggeriscono che lo sviluppo del processo neoplastico in sede diversa da quella di origine non determina una alterazione dell'espressione del recettore alfa degli estrogeni, come già riportato in letteratura per la donna (Fuqua, 2001). Vengono confermati inoltre i dati della letteratura che evidenziano una espressione più alta del recettore per gli estrogeni nel tessuto sano e nelle lesioni iperplastiche rispetto ai carcinomi (Millanta *et al.*, 2006). Per quanto riguarda il recettore del progesterone viene confermato quanto riportato in letteratura circa la

diminuzione di espressione nei tumori maligni rispetto al tessuto sano e circa il fatto che siano comunque evidenziabili rari tumori maligni che mantengono l'espressione del recettore (Millanta *et al.*, 2006). L'aumento dell'espressione del recettore del progesterone nelle lesioni displastiche rispetto al tessuto sano, riportato in letteratura da Millanta e colleghi (2006) non si è evidenziato nel presente lavoro che ha evidenziato invece mediamente una maggiore espressione del recettore nel tessuto sano (Millanta *et al.*, 2006).

La valutazione della proteina Her-2 ha evidenziato che solo il 5,2% delle lesioni maligne esaminate è risultato positivo. Tale valore si discosta notevolmente dai dati della letteratura che riportano nel gatto una positività variabile dal 39% al 90% e appare invece più assimilabile ai dati di positività nella donna che variano dal 20% al 30% (De Maria *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005; Winston *et al.*, 2005; Dalgin *et al.*, 2007). I diversi studi effettuati sui tumori mammari del gatto sono stati effettuati utilizzando anticorpi e protocolli di indagine immunoistochimica diversi. Secondo quanto riportato in umana la variazione nelle condizioni di analisi è in grado di influenzare di molto i risultati, al punto che il test riconosciuto e approvato dalla FDA per la donna, prevede il rispetto assoluto delle condizioni di indagine (anticorpo impiegato, tempistica, smascheramento). La variabilità dei metodi di indagine non permette quindi un adeguato confronto con i risultati da noi ottenuti. A tali difficoltà tecniche, legate specificamente alla molecola Her-2, che sembra risentire così fortemente del protocollo utilizzato, vi sono inoltre dati relativi al frequente disaccordo tra patologi umani nella distinzione tra il punteggio 1+ e 2+ e quindi nella classificazione, significativamente diversa, dei casi rispettivamente considerati negativi e positivi, con importanti conseguenze a livello di approccio terapeutico. Questo disaccordo nella valutazione della positività deriva sia da una certa soggettività nella percezione dell'intensità e della completezza della colorazione della membrana, sia da una possibile colorazione citoplasmatica che a volte può essere confusa con una positività incompleta della membrana. La diffusa opinione in letteratura, secondo cui la colorazione del citoplasma sarebbe aspecifica ha suggerito, nel presente lavoro, la scelta di un protocollo di indagine caratterizzato da uno smascheramento non troppo spinto, proprio per evitare un'esacerbazione di questo reperto che tuttavia, in un recente lavoro sul carcinoma endometriale della donna, è stato considerato significativo al pari della positività di membrana (Lambropoulou *et al.*, 2007). Si aggiunge inoltre il problema, già descritto in medicina umana, della eterogeneità della positività nella popolazione tumorale, per cui ad aree chiaramente positive corrispondono, nella stessa sezione, aree totalmente negative. Nel presente lavoro, avendo riscontrato il medesimo problema per alcuni casi, abbiamo deciso di considerare come positivi solo

quei tumori che dimostravano in modo inequivocabile una completezza di membrana in più del 10% delle cellule e ad esempio abbiamo escluso quei casi in cui c'erano zone, dove si poteva giustificare un punteggio 3+, associate a zone dove invece non si raggiungeva il punteggio 1+. La sovraespressione di Her-2 si è riscontrata anche nel 7,2% delle lesioni benigne/iperplastiche. Non ci sono autori che hanno analizzato in modo preciso l'espressione di Her-2 in queste lesioni del gatto.

Per quanto riguarda lo studio immunohistochimico della proteina P53, il 12% e il 10,6% delle neoplasie maligne prese in considerazione ha manifestato rispettivamente più dell'1% e più del 10% di cellule epiteliali neoplastiche positive. Questi dati sono inferiori rispetto a quelli riportati in letteratura (33% con più dell'1%, 18,9% con più del 10%), con il medesimo anticorpo, seppur con smascheramento antigenico diverso (Nasir *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2000).

Lo studio immunohistochimico della proteina Ki-67 ha evidenziato che l'indice MIB-1 può effettivamente essere considerato un buon indicatore della frazione di cellule ciclanti della popolazione, dato il suo incremento passando da forme iperplastiche/displastiche a forme neoplastiche benigne, fino a forme neoplastiche maligne.

Il test di Spearman è stato impiegato per la valutazione delle correlazioni tra i valori di espressione di 9 dei 12 marcatori molecolari in tutte le lesioni evidenziate. Per due di essi infatti i risultati di espressione si sono rivelati sempre attesi (calponina e alfa-sma) mentre la pancitocheratina è risultata sempre positiva. Le correlazioni esaminate per i soli carcinomi hanno preso in considerazione, in aggiunta, i valori di grading.

L'evidenziazione di una correlazione tra le percentuali di espressione di p53 e Ki67 che è risultata altamente significativa in tutti i campioni esaminati e significativa nei carcinomi, sottolinea il valore prognostico negativo di tali marcatori, indicato anche dalla correlazione marginalmente significativa che si è evidenziata tra espressione di Ki67 e il grading. Tali valutazioni trovano riscontro con quanto riportato in letteratura (Castagnaro *et al.*, 1998). Sulla base di ciò è considerata la correlazione negativa altamente significativa tra l'espressione del Ki67 e l'espressione dei recettori ormonali da una parte e le correlazioni positive, altamente significativa tra l'espressione del ki67 e l'espressione di citocheratine 14 e significativa tra ki67 e l'espressione di citocheratine 5/6 dall'altra, si possono distinguere due gruppi di lesioni neoplastiche caratterizzate da diverso comportamento biologico. I carcinomi che esprimono citocheratine 5/6 e citocheratina 14, l'espressione delle quali è risultata correlata in maniera altamente significativa, suggeriscono quindi la co-regolazione, appaiono caratterizzati da un comportamento biologico più aggressivo rispetto ai tumori che esprimono i recettori ormonali. Inoltre i valori di espressione di citocheratina

14 presentano una correlazione negativa statisticamente significativa e altamente significativa rispettivamente con i dati di espressione dei recettori del progesterone e degli estrogeni. I dati ottenuti indicano quindi che si possa considerare un paragone con i tumori definiti "basal like" nella donna che sono caratterizzati da una mancanza di espressione dei recettori ormonali e da comportamento aggressivo. Infine una correlazione negativa statisticamente significativa è stata evidenziata tra l'espressione di citocheratine 8/18 e l'espressione di ki67 e tra l'espressione dei recettori ormonali e il grading.

Relativamente alla variazione dell'espressione dei diversi marcatori nel confronto tra gruppi di lesioni (tumori maligni, tumori benigni, iperplasie, tessuti sani ed emboli/metastasi), valutato con il test di Krusk Wallis, è stato rilevato un aumento dell'espressione del ki67 altamente significativo nel gruppo dei tumori maligni rispetto al gruppo dei tessuti sani, una diminuzione statisticamente significativa dell'espressione dei recettori ormonali nei tumori maligni rispetto al gruppo dei tessuti sani e un aumento dell'espressione del p53 statisticamente significativo nei tumori maligni rispetto alle lesioni iperplastiche.

Per quanto riguarda i dati anamnestici e di follow up il test di Mann Whitney ha infine permesso di valutare l'espressione dei vari marcatori in categorie diverse, quali la sopravvivenza ad un anno dalla diagnosi, l'avvenuta sterilizzazione o meno dell'animale e lo sviluppo di metastasi. L'evidenziazione che il Ki67 è caratterizzato da una maggior espressione, statisticamente significativa, negli animali che erano deceduti entro l'anno dall'intervento chirurgico per l'asportazione della massa, conferma i dati della letteratura secondo i quali l'espressione del Ki67 assume nei tumori maligni un valore prognostico (Castagnaro *et al.*, 1998).

Valori di espressione più elevati statisticamente significativi del Ki67 e della citocheratina 14 sono stati rilevati infine nei tumori che hanno dato metastasi.

Riassumendo possiamo quindi dire che, in contrasto con quanto viene riportato in letteratura, HER-2 sembra avere un ruolo marginale nello sviluppo delle neoplasie mammarie del gatto. Tale dato potrebbe precludere l'individuazione e lo studio della categoria neoplastica "Her-2 positiva" importante in medicina umana per le ripercussioni terapeutiche.

Per quel che riguarda lo studio immunistochemico della proteina P53, per quanto i valori di espressione siano risultati inferiori rispetto a quelli riportati in letteratura, si sono evidenziate correlazioni significative con l'espressione di ki67 e il grading dei tumori maligni.

I dati di espressione dei filamenti citoplasmatici, valutati quest'ultimi al fine sia di chiarire gli aspetti istogenetici nel FMT (ruolo delle cellule epiteliali basali/luminali e mioepiteliali) sia di

valutare la presenza di una eventuale categoria “basal-like”, hanno evidenziato la ripetitività di citocheratine (acide e basiche totali), α -SMA e calponina (marcatore mioepiteliale) nel marcare rispettivamente l’intera popolazione neoplastica e la componente basale fusata (cellule mioepiteliali). L’identificazione di una componente mioepiteliale, non sempre morfologicamente distinguibile all’istologia, ha permesso di classificare con maggior precisione alcuni tipologie tumorali.

La valutazione della vimentina è risultata particolarmente interessante per la percentuale dei carcinomi positivi, in accordo con quanto riportato da alcuni studi (de las Mulas *et al.*, 1994), e per il pattern di positività osservato. In medicina umana la presenza di vimentina nel tumore al seno è a tutt’oggi oggetto di dibattito (Rodriguez-Pinilla *et al.*, 2007). Avendo osservato in questo studio cellule vimentina-positivo nei dotti interlobulari, non si esclude che popolazioni neoplastiche interamente (100%) positive possano derivare da tali strutture. In alcuni casi l’espressione della vimentina ha invece presentato pattern multifocale, anche se la morfologia della lesione appariva omogenea, suggerendo l’ipotesi del carattere policlonale di questi tumori.

I risultati di espressione della citocheratina 1414 hanno evidenziato, sia nelle neoplasie sia nel tessuto normale, una positività selettiva di un “pool” di cellule basali oltrechè di aree epiteliali in differenziazione simil-squamosa tipiche di strutture duttali. La positività di tale marcatore è risultata sempre presente in associazione all’espressione multifocale della vimentina, seppur con diverso andamento. Tale evidenza potrebbe indicare il coinvolgimento di una cellula pluripotente/basale e/o di origine duttale nella tumorigenesi. I dati di espressione di citocheratine 5/6 sembrano avvallare l’ipotesi di una affinità tra i tumori mammari felini ed i tumori “basal like” della donna.

BIBLIOGRAFIA

D.C. Allred, S.K. Mohsin, S.A.W. Fuqua, Histological and biological evolution of human premalignant breast disease, *Endocrine-related cancer*, 2001, 8: 47–61.

F.V. Amorim, H.J. Souza, A.M. Ferreira, A.B. Fonseca, Clinical, cytological and histopathological evaluation of mammary masses in cats from Rio de Janeiro, Brazil, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2006, 8(6): 379-88.

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

D.A. Arber, Effect of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical reactivity of breast markers, *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2002,10(2): 183-6.

M.V. Artufel, A.C. Valero, R.R. Llado, N.E. Sagales, M.C. Llorca, A.M. Carazo, C.C. Cardo, X.P. Torrus, Molecular protocol for HER2/neu analysis in breast carcinoma, *Clinical & translational oncology* : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico, 2005, 7(11): 504-11.

A. Bãnkfalvi, A. Ludwig, B. de-Hesselle, H. Buerger, I.B. Buchwalow, W. Boecker, Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases, *Modern Pathology*, 2004, 17(9):1051-61.

R. Bartsch, C. Wenzel, C.C. Zielinski, G.G. Steger, HER-2-Positive Breast Cancer: Hope Beyond Trastuzumab, 2007, *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 21(2): 69-77.

M. Bayaa, R.A. Booth, Y. Sheng, X.J. Liu, The classical progesterone receptor mediates *Xenopus*

oocyte maturation through a nongenomic mechanism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97: 12607–12612.

F. Behbod and J.M. Rosen, Will cancer cells provide new therapeutic targets?, *Carcinogenesis*, 2004, 26(4): 703-711.

W. Bocker, B.Bier, A. Ludwig, Benign proliferative lesions and in situ carcinoma of the breast: new immunohistological findings and their biological implications, *European journal of cancer prevention*, 1993, 2:41–49.

M.J. Bojrab, G.W. Ellison e B. Slocum. *Tecnica chirurgica*, volume 1, capitolo 36, pp.539-541, Utet 2004.

V. Boonyaratankornkit, M.P. Scott, V. Ribon, L. Sherman, S.M. Anderson, W.T. Miller, Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases, 2001, *Molecular cell*, 2001: 269–280.

W.B. Carter, G. Niu, Human epidermal growth factor receptor 2 regulates angiopoietin-2 expression in breast cancer via AKT and mitogen-activated protein kinase pathways, *Cancer Research*, 2007, 67(4): 1487-93.

P. Casalini, M.V. Iorio, 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>.

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

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

P. Chappell, J.S. Schneider, P. Kim, M. Xu, J.P. Lydon, B.W. O'Malley, Absence of gonadotropin surges and gonadotropin releasing hormone self-priming in ovariectomized (ovx), estrogen (E2)-treated progesterone receptor knockout (PRKO) mice, 1999, *Endocrinology* 140: 3653-3658.

R.T. Chatterton, J.P. Lydon, R.G. Metha, E.T. Mateo, A. Pletz, V.C. Jordan, Role of the progesterone receptor (PR) in susceptibility of mouse mammary gland to 7,12-dimethylbenzaanthracene-induced hormone-independent preneoplastic lesions in vitro, 2002, *Cancer Letterature*, 188: 47-52.

Y. Cho, S. Gorina, P.D. Jeffrey, N.P. Pavletich, Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations, *Science*, 1994, 265(5170): 334-5.

D.R. Ciocca, M.A. Fanelli, Estrogen receptor and cell proliferation in breast cancer, *Trends in endocrinology and metabolism*, 1997, 8: 313-321.

J.H. Clark, C.S. Watson, B.M. Markaverich, J.S. Syne, W.B. Panko, Heterogeneity of estrogen binding sites in mammary tumors, *Breast Cancer Research and Treatment*, 1983, 3(1): 61-5.

H. Clayton, I. Titley, M.M. Vivano, Growth and differentiation of progenitor/stem cells derived from the human mammary gland, *Experimental cell research*, 2004, 297: 444-460.

O.M. Conneely, B.M. Jericevic, J.P. Lydon, Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2003, 2: 205-214.

C.G. Couto e R. W. Nelson., *Medicina Interna del Cane e del Gatto*, capitolo 58, pp.903-904, Elsevier, 2006.

J.E. Crouch, M.B. Lackey, The mammary gland-Its structure, relationships and blood supply, *Text-atlas of Cat Anatomy*, p.183, Eds Crouch JE & Lackey, 1969.

D. Dabbs, Diagnostic Immunohistochemistry, 2006, Second Edition

D.J. Dabbs, A.M. Gown, Distribution of calponin and smooth muscle myosin heavy chain in fine-needle aspiration biopsies of the breast, *Diagnostic Cytopathology*, 1999, 20(4): 203-7.

S. Damiani, M. Ludvikova, G. Tomasic, S. Bianchi, A.M. Gown, V. Eusebi, Myoepithelial cells and basal lamina in poorly differentiated in situ duct carcinoma of the breast. An immunocytochemical study, *Virchows Archiv : an International Journal of Pathology*.1999, 434(3): 227-34.

G.S. Dalgin, G. Alexe, D. Scandfeld, P. Tamayo, J.P. Mesirov, S. Ganesan, C. DeLisi, G. Bhanot, Portraits of breast cancer progression, *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 291.

K. M. Dameron, O.V. Volpert, M.A. Tainsky, N. Bounck, Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1, *Science*, 1994, 5178: 1582-1584.

M. de las Mulas J, E. de los Monteros, M.J. Bautista, Gómez-Villamandos JC, Morales C. Immunohistochemical distribution pattern of intermediate filament proteins and muscle actin in feline and human mammary carcinomas, *Journal of Comparative Pathology*, 1994, 111(4): 365-81.

H.D. Dellman e J.A. Eurell, *Istologia e Anatomia Microscopica Veterinaria*, capitolo 16, pp. 433-434, Casa Editrice Ambrosiana, 2000.

R. De Maria, M. Oliviero, S. Iussich, N. Munekazu, T. Murata, B. Biolatti, M.F. Di Renzo, Spontaneous Feline Mammary Carcinoma is a Model of HER2 Overexpressing Poor Prognosis Human Breast Cancer, *Cancer Research*, 2005, 65(3).

M.A. Deugnier, M.M. Faraldo, B. Janji, P. Rousselle, J.P. Thiery, M.A. Glukhova, EGF controls the in vivo development potential of a mammary epithelial cell line possessing progenitors properties, *The Journal of Cell Biology.*, 2002 ,159(3): 453-63.

V. Dieras, A. Vincent-Salomon, A. Degeorges, P. Beuzeboc, L. Mignot, P. De Cremoux,

Trastuzumab (Herceptin) and breast cancer: mechanism of resistance, *Bull Cancer*, 2007, 94(3): 259-66.

J.M. Dobson, J. Morris, *Small Animal Oncology*, 2001, pp.4-191.

M. Dolores Pérez-Alenza, Á. Jiménez, A. I. Nieto, L. Peña: First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases *Breast Cancer Research* 2004, 6:R300-R307.

I. Donnay, J. Raios, P. Wouters-Ballaman, N. Devlee Shouwer, G. Leclerq, J.P. Verstegen, Receptor for estrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal ant tumorous canine mammary tissues, 1993, *Journal of Reproduction and Fertility*, Supp 1 47: 501-512.

C.R. Dorn, D.O.N. Taylor, R.Schneider, H.H. Hibbard., M.R. Klauber: Survey of animal neoplasm in Alameda and Contra Costa countries, California II .Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda country, *Journal of national Cancer Institute*, 1968, 40: 307-318.

R. Dulbecco, W.R. Allen, M. Bologna, M. Bowman, Marker evolution during the development of the rat mammary gland: stem cells identified by markers and the role of myoepithelial cells, *Cancer research*, 1986, 46: 2449-2456.

K.M. Dyce, W.O. Sack,C.J.G. Wensing, *Testo di Anatomia Veterinaria*, capitolo 14, pp.417-419, Antonio Delfino Editore, 2006.

S.A. Eccles, The role of c-erbB-2/HER2/neu in Breast Cancer Progression and Metastasis, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2004, 4: 393-406.

C.W. Elston, I.O.Ellis: Tumors of the breast. In *Diagnostic Histopathology of Tumors*, C.D.M. Fletcher, 635-689 ed. Churchill Livingstone, New York, 1991.

A. Espinosa Los de Monteros, M.Y. Millán, J. Ordás, L. Carrasco, C. Reymundo, J. Martín Las de 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, *Veterinary Pathology*, 2002, 39(2): 247-56.

N. Fausto, A.K. Abbas, V. Kumar, *Pathologic Basis of disease* 7th edition, 2005, capitolo 23, pp.1136-1137.

D.G. Feldman, L. Gross, Electron microscopic study of spontaneous mammary carcinomas in cats and dogs: Virus-like particles in cat mammary carcinomas. *Cancer Research*, 1971, 31: 1261-1267.

S.A.W. Fuqua, The role of estrogen receptor in breast cancer metastasis. *Journal of Mammary gland Biology and Neoplasia*, 2001, 6(4): 407-417.

G. Gasparini, Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer, *The Oncologist*, 2000, Vol. 5, Suppl 1, 37-44.

A.P. Gouvea, F. Milanezi, S.J. Olson, D. Leitao, F.C. Schmitt, H. Gobbi, Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 2006, 14(1):103-8

V.E. Gould, W. Jao, H. Battifora, Ultrastructural analysis in the differential diagnosis of breast tumors: the significance of myoepithelial cells, basal lamina, intracytoplasmic lumina and secretory granules, *Pathology, research and practice*, 1980, 167: 45-57.

V. E. Gould, G. K. Koukoulis, D. S. Jansson, R. B. Nagle, W. W. Franke, R. Moll, Coexpression patterns of vimentin and glial filament protein with cytokeratin in normal, hyperplastic and neoplastic breast, *American Journal of Pathology*, 1990, 137(5): 1143–1155.

B. Gusterson, M.J. Warburton, D. Mitchell, Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in benign and malignant breast disease, *Cancer research*, 1982; 42: 4763-4770.

K.A. Hahn, L. Bravo, J.S. Avenell, Feline breast carcinomas as a pathologic and therapeutic model for human breast cancer, *In Vivo*, 1994, 8: 825-828.

J.M Hamilton, R.W. Else, P. Forshaw: Oestrogen receptor in feline mammary carcinomas. *Veterinary Research*, 1976, 99: 477-479.

J.F. HAMPE, W. MISDORP, Tumours and dysplasia of the mammary gland, *Bull World Health Organ*, 1974, 50: 111-113.

D.W. Hayden, S.W. Nielsen, Feline mammary tumors, *Small Animal Practice*, 1971, 12: 687-98.

H.M.Jr. Hayes, K.L. Milne, C.P. Mandell, Epidemiological features of feline mammary carcinoma, *Veterinary Record*, 1981, 108: 476-479.

T.A. Hopp, S.A.W. Fuqua, Estrogen receptor variants. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 1998, 3 (1): 73-83.

T. Ito, T. Kadosawa, M. Mochizuki, S. Matsunaga, R. Nishimura, N. Sasaki: Prognosis of malignant mammary tumors in 53 cats, *Journal of Veterinary Medical Science*, 1996, 58(8): 723-726.

A.D. Jarasch, R.B. Nagle, M. Kaufmann, C. Maurer, W.J. Bocker, Differential diagnosis of benign epithelial proliferations and carcinomas of the breast using antibodies to cytokeratins, *Human Pathology*, 1988, 19; 276-289.

D.A. Kamstock., D.A. Kamstock, R. Fredrickson, E.J. Ehrhart: Lipid-rich Carcinoma of the Mammary Gland in a Cat; *Veterinary Pathology* 2005, 42:360–362.

P.Kastner, A.Krust, B.Turcotte, U.Stropp, L.Tora, H.Gronemeyer and P.Chambon, Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B, *The EMBO Journal*, 1990, 9(5): 1603 – 1614-

S.R. Lakhani, R.Chaggar, S. Davies, Genetic alterations in 'normal' luminal and myoepithelial cells of the breast, *The Journal of Pathology*, 1999, 189: 496–503.

D. Lazard, X. Sastre, M.G. Frid, M.A. Glukhova, J.P. Thiery, V.E. Kotliansky, Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 1;90(3): 999-1003.

S.A. Leonhardt, V. Boonyaratanakornkit, D.P. Edwards. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms, *Steroids*, 2003, 68(10-13): 761-70.

T.Y.M. Leong, A.S.Y. Leong, Review Article, Controversies in the Assessment of HER-2, More questions Than Answers, *Advances in anatomic pathology*, 2006, 13: 263-269.

E. Lerma, G. Peiro, T. Ramón, S. Fernandez, D. Martinez, C. Pons, F. Muñoz, J.M. Sabate, C. Alonso, B. Ojeda, J. Prat, A. Barnadas, Immunohistochemical heterogeneity of breast carcinomas negative for estrogen receptors, progesterone receptors and Her2/neu (basal-like breast carcinomas), *Modern Pathology*, 2007, 20(11):1200-7.

A.J. Levine, W. Hu, Z. Feng, The p53 pathway: what questions remain to be explored?, *Cell Death and Differentiation*, 2006, 13: 1027-1036.

C.A. Livasy, G. Karaca, R. Nanda, M.S. Tretiakova, O.I. Olopade, D.T. Moore, C.M. Perou, Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma, *Modern Pathology*, 2006, 19(2): 264-71.

J.P. Lydon, F.J. DeMayo, C.R. Funk, S.K. Mani, A.R. Hughes, Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities, *Gene Development*, 1995, 9: 2266-2278.

E.G. MacEwen: Spontaneous tumors in dogs and cats: Model for the study of cancer biology and treatment, *Cancer and Metastasis Reviews*, 1990, 9: 125-136.

E.G. MacEwen, A.A. Hayes, J. Harvey, A.K. Patnaik, S. Mooney, S. Passe: Prognostic factors for feline mammary tumors. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1984, 185 (2): 201-204.

E.G. MacEwen, S.J. Withrow: Tumors of the mammary gland. *Small Animal Clinical Oncology*, Eds. W.B. Daunders, London, 1996 pp 356-379.

B.S. McEwen, Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends in pharmacological sciences*, 1991, 12: 141–147.

K. Malzahn, M. Mitze, M. Thoenes, R. Moll, Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas, *Virchows Arch*, 1998, 433: 119-129.

J. Martín de las Mulas, A. Espinosa de los Monteros, M.J. Bautista, J.C. Gómez-Villamandos, Morales C Immunohistochemical distribution pattern of intermediate filament proteins and muscle actin in feline and human mammary carcinomas, *Journal of Comparative Pathology*, 1994, 111(4): 365-81.

J. Martín de las Mulas, M. Van Niel, Y. Millán, J. Ordás, M.A. Blankenstein, F. Van Mil, W. Misdorp, Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status, *Research in Veterinary Science* 2002, 72: 153-161.

J. Martín De las Mulas, J. Ordàs, Y. Millàn, V. Fernández-Soria, S. Ramòny Cajal, Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study, *Breast Cancer Research and Treatment*, 2003, 80(3): 363-7.

P.M. Martin, M. Cotard, J.P. Mialot, F. André, J.P. Raynaud, Animal models for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1984, 12(1): 13-7.

B. Mayr, J. Blauesteiner, A. Edlinger, M. Reifinger, K. Alton, G. Schaffner, G. Brem, Presence of

p53 mutation in feline neoplasms, *Research in Veterinary Science*, 2000, 68(1): 63-70.

A. Michalczyk, R.W. Brown, J.P. Collins, Lactating affects expression of intermediate filaments in human breast epithelium. *Differentiation*, 2000, 67: 41-4.

A. Migliaccio, D. Piccolo, G. Castoria, M. Di Domenico, A. Bilancio, M. Lombardi, Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor, *EMBO Journal*, 1998, 17: 2008–2018.

F. Millanta, M. Calandrella, S. Citi, D. Della Santa, A. Poli, Overexpression of HER-2 in Feline Invasive Mammary Carcinomas: An Immunohistochemical Survey and Evaluation of Its Prognostic Potential, *Veterinary Pathology*, 2005, 42: 30-34.

F. Millanta, G. Lazzeri, M. Mazzei, I. Vannozzi, A. Poli, MIB-1 Labeling Index in Feline Dysplastic and Neoplastic Mammary Lesions and Its Relationship with Postsurgical Prognosis, *Veterinary Pathology*, 2002, 39: 120-126.

F. Millanta, M. Calandrella, G. Bari, M. Niccolini, I. Vannozzi, A. Poli, Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues, *Research in Veterinary Science*, 2005, 79(3): 225-32.

F. Millanta, M. Calandrella, I. Vannozzi, A. Poli, Steroid hormone receptors in normal, dysplastic and feline mammary tissues and their prognostic significance, *Veterinary Research*, 2006, 158(24): 821-4.

W. Misdorp: Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay. *Domestic Animal Endocrinology*, 18: 111-125, 2000.

W. Misdorp: Tumors in domestic animals (D.J.Meuten Editor), capitolo 12, pp.575-607. Iowa State University Press, Ames IA, 4th edition, 2002.

W. Misdorp, R.W. Else, E. Hellmèn, T.P. Lipscomb, Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. In WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, volume 7 di 2nd, Armed Force Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 2001.

J.A. Mol, E. Van Garderen, G.R. Rutterman, A. Rijnberk, New insight in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans, *J Steroid Biochemical Mol Biol*, 1996, 57(1-2): 67-71.

R. Moll, W.W. Franke, D.L. Schiller, The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells; *Cell*, 1982, 31: 11-24.

U.M. Moll, G. Riou, A.J. Levine, Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89(15): 7262-6.

J.S. Morris, C. Nixon, A. Bruck, L. Nasir, I.M. Morgan, A.W. Philbey, Immunohistochemical expression of TopBP1 in feline mammary neoplasia in relation to histological grade, Ki67, ER α and p53, 2007, *The Veterinary Journal*, doi: 10.1016/j.tvjl.2007.01.006.

P.A. Mote, S. Bartow, N. Tran, C.L. Clarke, Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis, *Breast Cancer Research and Treatment*, 2002, 72:163-172.

M. Mrhalová, R. Kodet, M. Kalinová, I. Hilská, Relative quantification of ERBB2 mRNA in invasive duct carcinoma of the breast: correlation with ERBB-2 protein expression and ERBB2 gene copy number, *Pathology, Research and Practice*, 2003, 199(7): 453-61.

Y. Murakami, S. Tateyama, A. Rungsipipat, K. Uchida, R. Yamaguchi, Immunohistochemical Analysis of Cyclin D1 and P53 in mammary Tumors, Squamous Cell Carcinomas and Basal Cell tumors of Dogs and Cats, *J. Vet. Med. Sci*, 2000, 62(7): 743-750.

M. Nakano, H. Wu, Y. Taura, M. Inoue, Immunohistochemical Detection of Mdm2 and p53 in Feline Mammary Gland Tumors, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2005, 68(5): 421-425.

L. Nasir, H. Krasner, D.J. Argyle, A. Williams, Immunocytochemical analysis of the tumour suppressor protein (p53) in feline neoplasia, *Cancer Letters*, 1999, 155 :1-7.

R. Nickel R, A. Schummer, E. Seiferle, *Trattato di Anatomia degli Animali Domestici*, 1992 Vol III.

M. Okuda, A. Umeda, T. Sakai, T. Ohashi, Y. Momoi, H.Y. Youn, T. Watari, R. Goitsuka, H. Tsujimoto, A. Hasegawa, Cloning of feline p53 tumor-suppressor gene and its aberration in hematopietic tumors, *International Journal of Cancer*, 1994, 58(4): 602-7.

D.A. Olsen, B. Ostergaard, S. Bokmand, P.A. Wamberg, E.H. Jakobsen, I. Brandslund, HER-2 protein concentrations in breast cancer cells increase before immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis turn positive, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2007, 45(2): 177-82.

J. Ordas, Y. Millan, A.E. de los Monteros, C. Reymundo, J. Martin de las Mulas , Immunohistochemical expression of progesterone receptors, growth hormone and insulin growth factor-1 in feline fibroadenomatous change, *Research in Veterinary Science*, 2004, 76(3): 227-33.

F. Otterbach, A. Bankfalvi, F.M. Bergner, T. Decker, R. Krech, W. Boecker, Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferation of the breast, *Histopathology*, 2000, 37: 232-240.

B. Overley, F.S. Shofer, M.H. Goldschmidt, D. Sherer, K.U. Sorenmo, Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2005, 19(4): 560-3.

L.N. Owen: A comparative study of canine and human breast cancer. *Investigative and Cell*

Pathology 1979; 2(4): 257-275.

A. Paganini-Hill, P.C. Wan, M.C. Pike, Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: Estrogen versus estrogen plus progestin, *Journal of National Cancer Institute*, 2000, 92: 328-332.

J.T. Papadimitriou, M. Stampfer, J. Bartek, A. Lewis, M. Boshell, E.B. Lane, I.M. Leigh, Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium, *Journal of Cell Science*, 1989, Vol 94(3): 403-413.

C. P  choux, T. Gudjonsson, L. Ronnov-Jessen, M.J. Bissell, O.W. Petersen, Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Developmental Biology*, 1999, 206(1): 88-99.

C.M. Perou, T. S  rlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Aksten, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. L  nning, A.L. B  rresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein, Molecular portraits of human breast tumors, 2000, *Nature*, 406, 17.

S.S. Pinho, A.J. Matos, C. Lopes, N.T. Marcos, J. Carvalheira, C.A. Reis, F. G  rtner, Sialyl Lewis x expression in canine malignant mammary tumours: correlation with clinicopathological features and E-Cadherin expression, *BMC Cancer*, 2007, 6;7:124.

S.M.R. Pinilla, D. Sarri  , E. Honrado, G. Moreno-Bueno, D. Hardisson, F. Calero, J. Ben  tez, J. Palacios, Vimentin and laminin expression is associated with basal-like phenotype in both sporadic and BRCA1-associated breast carcinomas, *Journal of Clinical Pathology*, 2007, 60(9): 1006-12.

L. Pusztai, C. Mazouni, K. Anderson, Y. Wu, W.F. Symmans, Molecular Classification of Breast Cancer: Limitations and Potential, *Oncologist*, 2006, 11: 868-877.

J.S. Reis-Filho, A.N.J. Tutt, Triple negative tumors: a critical review, *Histopathology*, 2008, 52: 108-118.

- G.R. Ruteman, Hormones and mammary tumour disease in the female dog, *In Vivo*, 1990, 4: 33-40.
- E.A. Sartin, S. Barnes, R.P. Kwapien, L.G. Wolfe, Estrogen and progesteron receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinicals outcome in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 1992, 53: 2196-2200.
- A. Smiech, W. Lopuszyński, Z. Nozdryn-Plotnicki, Studies on histogenesis of mixed tumours of the mammary gland in bitches, *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2002, 5(4): 217-22.
- W.C. Powell, D.G. Hicks, N. Prescott, M. Shannon, S.M. Tarr, S. Laniauskas, T. Williams, S. Short, J. Pettay, R. Nagle, D. Dabbs, K. Scott, R. Brown, T. Grogan, P. Roche, R. Tubbs, A new Rabbit monoclonal antibody (4B5) for the Immunohistochemical (IHC) Determination of the HER2 status in Breast Cancer: Comparison With CB11, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), and Interlaboratory Reproducibility, 2007, *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 1062-33.
- R. Preziosi, G. Sarli, C. Benazzi, P.S. Marcato, Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours, *Journal of Comparative Pathology*., 1995, 113(4): 301-13.
- L. Pusztai, C. Mazouni, K. Andersen, Y. Wu, W.F. Symmans, Molecular classification of breast cancer: limitations and potential; *Oncologist*, 2006, 11: 868-877.
- F. Raharison, J. Sautet: Lymph drainage of the mammary glands in female cats. *Journal of Morphology*, 2005: 267(3): 292-299
- L.N. Ramalho, A. Ribeiro-Silva, G.D. Cassali, S. Zucoloto, *Veterinary Pathology*, The expression of p63 and cytokeratin 5 in mixed tumors of the canine mammary gland provides new insights into the histogenesis of these neoplasms, 2006, 43(4): 424-9.
- J.A. Ramos-Vara, Review Article, Technical Aspects of Immunohistochemistry, *Veterinary Pathology*, 2005, 42: 405-426.
- M. Razandi, A. Pedram, G.L. Greene, E.R. Levin, Cell membrane and nuclear estrogen receptors

(ERs) originate from a single transcript: Studies of ER alpha and ER beta expressed in Chinese hamster ovary cells, *Molecular Endocrinology*, 1999; 13 (2): 307-319.

S. Ricardo, F. Milanezi, S. Cavalho, D. Leitaó, F. Schmitt, HER2 Evaluation through the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and CISH in tissue microarrays of invasive breast cancer carcinomas, *Journal of Clinical Pathology*, 2006, 60(9): 1001-5.

S. L. Robbins, R.S. Cotran, V. Kumar, *Basic Pathology* 7th edition, 2003, capitolo 6, pp.166-197.

R.K. Ross, A. Paganini-Hill, P.C. Wan, M.C. Pike, Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: Estrogen versus estrogen plus progestin, *Journal of the National Cancer Institute*, 2000, 92: 328-332.

G. Sarli, R. Preziosi, C. Benazzi, R. Bazzo, L. Mandrioli, P.S. Marcato, Rate of apoptosis in feline mammary tumors is not predictive of postsurgical survival, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2003, 15: 115-122.

M.J. Scian, K.E.R. Stagliano, M.A. Ellis, S. Hassan, M. Bowman, M.F. Miles, S.P. Deb, S. Deb, Modulation of Gene Expression by Tumor-Derived p53 Mutants, *Cancer Research*, 2004, 64: 7447-7454.

A. Scibelli, D. D'Angelo, A. Pelagalli, S. Tafuri, L. Avallone, R. Della Morte, N. Staiano, Expression levels of the focal adhesion-associated proteins paxillin and p130CAS in canine and feline mammary tumors, *Vet Res*, 2003, 34(2): 193-202.

F. Seixas, M.A. Pires, C.A. Lopes, *Veterinary Journal*, Complex carcinomas of the mammary gland in cats: Pathological and immunohistochemical features. 2007, 23.

J.A. Shaw, K. Udokang, J.M. Mosqueira, H. Chauhan, J.L. Jones, Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *Journal of Pathology*, 2002, 198: 450-457.

S. Signoretti, L. Di Marcotullio, A. Richardson, Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2002. 110: 633-641.

R. Sitruk-Ware, Progestins in hormonal replacement therapy (HRT): new molecules, risks and benefits, *L'Année endocrinologique*, 2003, 64(2): 178.

K.A. Skorupski, B. Overley, F.S. Shofer, M.H. Goldschmidt, C.A. Miller, K.U. Sorenmo, Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats, *Journal of veterinary internal medicine/American College of Veterinary Internal Medicine*, 2005, 19(1): 52-5.

G.H. Smith, D. Medina, A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland, *Journal of Cell Science*, 1988, 90: 173-83.

K. Sorenmo, Canine mammary gland tumors, *Veterinary Clinics of North American. Small Animal Practice*, 2003, 33(3):573-96.

J. Stingl, A. Raouf, J.T. Emerman, C.J. Eaves, Epithelial Progenitors in the Normal Human Mammary gland, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2005, 10(1).

C.R. Taylor, S.R. Shi, B. Chaiwun, L. Young, S.A. Imam, R.J. Cote, Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques, *Human Pathology*, 1994, 25(3): 263-70.

O.W. Tawfik, B.F. Kimler, M. Davis, J.K. Donahue, D.L. Persons, F. Fan, S. Hagemester, P. Thomas, C. Connor, W. Jewell, C.J. Fabian, Comparison of immunohistochemistry by automated cellular imaging system (ACIS) versus fluorescence in situ hybridization in the evaluation of HER-2/neu expression in primary breast carcinoma, *Histopathology*, 2006, 48: 258-267.

T. Thomson, M.M. Hayes, J.J. Spinelli, E. Hilland, C. Sawrenko, D. Phillips, B. Dupuis, R.L. Parker, HER-2/neu in Breast Cancer: Interobserver Variability and Performance of

Immunohistochemistry with 4 Antibodies Compared with Fluorescent In situ Hybridization, *Modern Pathology*, 2001, 14(11): 1079-1086.

K. Thriveni, V. Deshmane, P.P. Bapsy, L. Krishnamoorthy, G. Ramaswamy, Clinical utility of serum human epidermal receptors-2/neu detection in breast cancer patients, 2007, *Indian Journal of Medicine Research*, 125: 137-42.

J. Tian, S. Kim, E. Heilig and J.V. Ruderman, Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97: 14358–14363.

W. Traut, E. Endl, T. Scholzen, J. Gerdes, H. Winking, The temporal and spatial distribution of the proliferation associated Ki-67 protein during female and male meiosis, *Chromosoma*, 2002, Vo 111, No 3, pp.156-164

R.R. Tubbs, J.D. Pettay, P.C. Roche, M.H. Stoler, R.B. Jenkins, T.M. Grogan, Discrepancies in Clinical Laboratory Testing of Eligibility for Trastuzumab Therapy: Apparent Immunohistochemical False-Positive Do Not Get the Message, *Journal of Clinical Oncology*, 2001, 19: 2714-2721.

A. Urruticoechea, I.E. Smith, M. Dowsett, Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 2005, Vol 23, No 28, pp.7212-7220.

D.M. Vail, E.G. MacEwen: Spontaneous occurring tumors of companion animals as models of human cancer, *Cancer Investigation*, 2000, 18 (8):781-792.

U. Vijapurkar, M.S. Kim, J.G. Koland, Roles of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3'-kinase in ErbB2/ErbB3 coreceptor-mediated heregulin signaling, *Experimental Cell Research*, 2003, 284(2): 291-302.

J.G. Vilches-Moure, J.A. Ramos-Vara, Comparison of rabbit monoclonal and mouse monoclonal antibodies in immunohistochemistry in canine tissue, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2005, 17: 346-350.

R.J. Viste, S.L. Myers, B. Singh, E. Simko, Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator, *The Canadian Veterinary Journal*, 2002, 43(1): 33-37.

J.H. Vos, T.S. van den Ingh, W. Misdorp, R.F. Molenbeek, F.N. van Mil, G.R. Rutteman, D. Ivanyi, F.C. Ramaekers, Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and alpha-smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: malignant mammary tumours, *Vet Q*, 1993, 15(3): 96-102.

J.D. Webster, V. Yuzbasiyan-Gurkan, R.A. Miller, J.B. Kaneene, M. Kiupel: Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication, *Veterinary Pathology*, 2007, 44: 298-308.

K. Weijer, A.A.M. Hart: Prognostic factors in feline mammary carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 1983, 70 (4): 709-716.

K. Weier, K.W. Head, W. Misdorp, J.F. Hampe: Feline malignant mammary tumors I. Morphology and biology: some comparisons with human and canine mammary carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 1972, 49: 1697-1704.

J.M. Williams, C.W. Daniel, Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis, *Developmental Biology*, 1983, 97(2): 274-90.

S.J. Winder, M.P. Walsh, Calponin: Thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction, *Cell Signaling*, 1993, 5: 677-686.

J. Winston, D.M. Craft, T.J. Scase, P.J. Bergman, Immunohistochemical detection of HER-2/neu expression in spontaneous feline mammary tumours, *Veterinary and Comparative Oncology*, 2005, 3(1): 8-15.

A.C. Wolff, M.E. Hammond, J.N. Schwartz, K.L. Hagerty, D.C. Allred, R.J. Cote, M. Dowsett, P.L. Fitzgibbons, W.M. Hanna, A. Langer, L.M. McShane, S. Paik, M.D. Pegram, E.A. Perez, M.F.

Press, A. Rhodes, C. Sturgeon, S.E. Taube, R. Tubbs, G.H. Vance, M. van de Vijer, T.M. Wheeler, D.F. Hayes, American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factors receptor 2 testing in breast cancer, *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2007, 25(1): 118-45.

H. Yaziji, A.M. Gown, N. Sneige, Detection of stromal invasion in breast cancer: myoepithelial markers, *Advances in Anatomic pathology*, 2000, 7:100-109.

V. Zappulli, G. De Zan, B. Cardazzo, L. Bargelloni, M. Castagnaro, Feline mammary tumors in comparative oncology, *Journal of Dairy Research*, 2005, 72: 98-106.

G.H. Zhang, W.T. Yang, X.Y. Zhou, Y. Zeng, H.F. Lu, D.R. Shi, Study of the correlation between HER-2 gene and lymphangiogenesis and their prognostic significance in human breast cancer, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2007, 87(3): 155-60.