



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA VETERINARIA

TESI DI LAUREA

**“VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA
DELL’ESPRESSIONE DEI RECETTORI PER ESTROGENI
(ER α) E PROGESTERONE (PR) NEL TUMORE
MAMMARIO CANINO:
RELAZIONE CON ASPETTI CLINICI E PATOLOGICI”**

LAUREANDA: MARTA MAINENTI

RELATRICE: PROF. VALENTINA ZAPPULLI

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

INDICE GENERALE

INTRODUZIONE.....	1
Ghiandola mammaria.....	1
Sviluppo della ghiandola mammaria del cane	1
Anatomia della ghiandola mammaria del cane	3
Tumore mammario canino	6
Epidemiologia	6
Presentazione clinica	8
Diagnosi e staging del tumore mammario canino	9
Classificazione e grading.....	11
Terapia	14
Estrogeni e Progesterone.....	17
Produzione e funzioni fisiologiche.....	17
Estrogeni e progesterone e la ghiandola mammaria	18
Ruolo nella cancerogenesi mammaria.....	19
Indipendenza ormonale e valore prognostico	22
Ovariectomia ed ovariosterectomia: effetti sulla mammella.....	23
Studi immunohistochimici di ER e PR nel tumore mammario	24
SCOPO DELLA TESI.....	26
MATERIALI E METODI.....	27
Campioni e raccolta dati Follow up.....	27
Esame istopatologico	27
Esame immunohistochimico	28
Tecnica e strumenti.....	28
Anticorpi e Protocolli	29
Valutazione della positività.....	30
Analisi statistica	30
RISULTATI.....	32
Dati anamnestici e follow up	32
Analisi istopatologica	32
Analisi immunohistochimica	35
Valutazione statistica dei risultati.....	42
DISCUSSIONE.....	44

CONCLUSIONE	51
APPENDICE I.....	53
APPENDICE II.....	54
APPENDICE III.....	57
APPENDICE IV	64
APPENDICE V.....	67
APPENDICE FOTOGRAFICO	71
BIBLIOGRAFIA	81

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1: Drenaggio linfatico della ghiandola mammaria normale e neoplastica di cagna, secondo gli studi di Patsikas et al., 1996, 2006.....	9
Tabella 2: Sistema per il calcolo del grading istologico di malignità di Misdorp (Misdorp, 2002).....	13
Tabella 3: Sistema per il calcolo del grading istologico di malignità di Clemente e collaboratori (Clemente et al., 2010).....	13
Tabella 4: Schema delle fasi principali dei protocolli immunohistochimici di ER α e PR. .	29
Tabella 5: Classificazione istopatologica dei 113 campioni nelle sottopopolazioni interi e non interi e rispettivo grading delle neoplasie maligne.....	34
Tabella 6: Distribuzione dei campioni secondo lo status recettoriale del tessuto sano e neoplastico.	36
Tabella 7: Percentuale media e intensità di espressione di ER α e PR nel tessuto sano/iperplastico e neoplastico e nelle sottopopolazioni di soggetti interi e non interi.....	37
Tabella 8: Distribuzione dell'intensità del segnale di espressione di PR ed ER α nel tessuto neoplastico benigno e maligno.....	38
Tabella 9: Media di espressione recettoriale di PR ed ER α nelle diverse tipologie tumorali.....	39
Tabella 10: Percentuale media e intensità di espressione di ER α e PR nelle neoplasie maligne di diverso grading istologico e nelle sottopopolazioni di soggetti interi e non interi.	40
Tabella 11: Medie percentuali ed intensità di espressione di PR ed ER α nel tessuto sano e neoplastico dei campioni con negatività ad uno dei due anticorpi o entrambi nel tessuto sano.....	41

INTRODUZIONE

Ghiandola mammaria

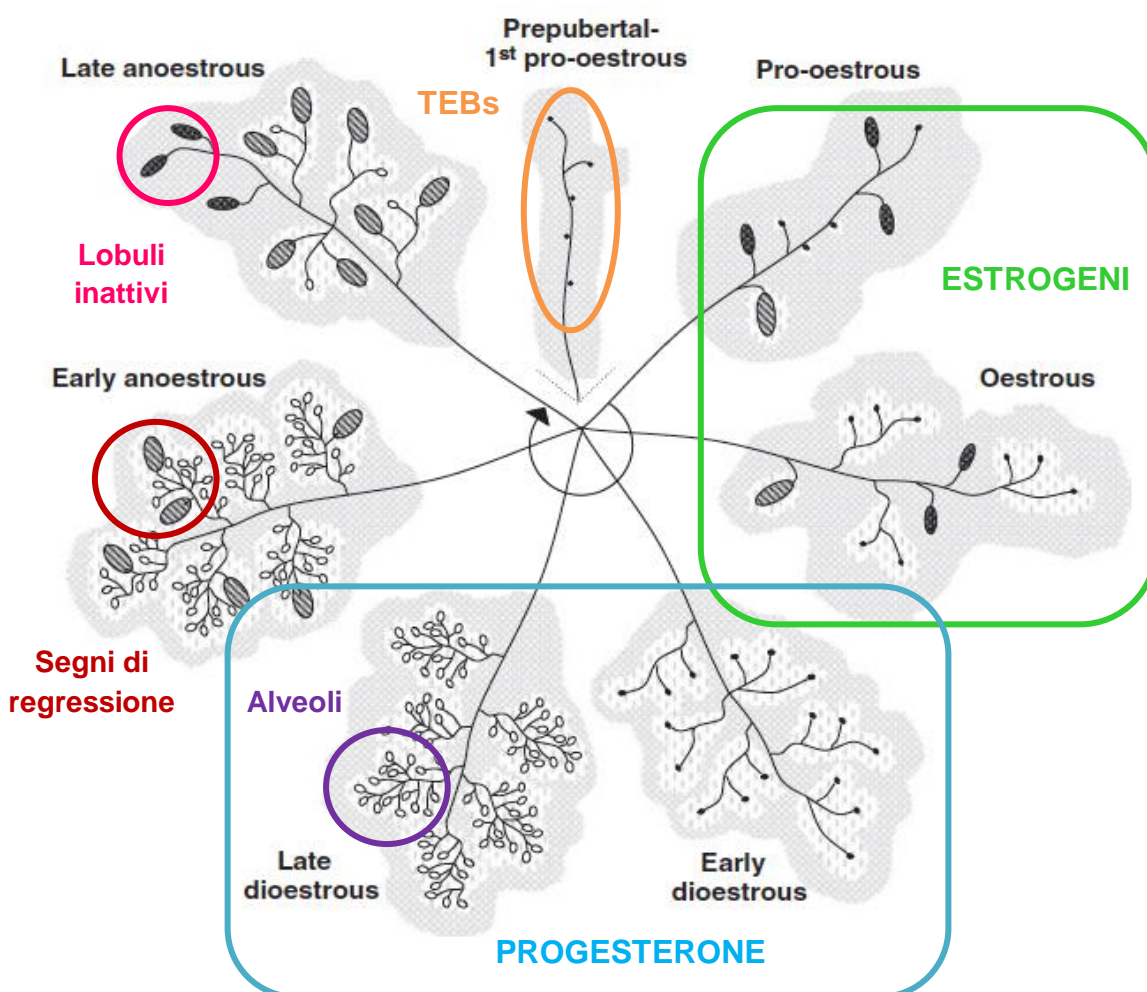
Sviluppo della ghiandola mammaria del cane

La ghiandola mammaria del cane, come negli altri mammiferi, ha uno sviluppo unico in tutto l'organismo: si origina in età embrionale, rimane immatura sino al raggiungimento della pubertà, dove si sviluppa sotto la guida di un'interazione complessa tra ormoni steroidei ovarici, ormoni polipeptidici sistemici, fattori di crescita locali e citochine, e raggiunge il completo sviluppo solo in gravidanza, nell'animale adulto (Moulton *et al.*, 1990; Watson *et al.*, 2008). Durante l'embriogenesi, a partire da ispessimenti ectodermici lineari (le creste mammarie, a cui corrisponderanno le linee mammarie) si originano delle gemme epiteliali, che si accrescono nel mesenchima sottostante. La proliferazione del mesenchima che circonda la gemma fa sporgere una papilla (il capezzolo) sulla superficie del corpo della mammella, e uno o più zaffi epidermici della gemma mammaria si accrescono nel connettivo della papilla e cominciano a canalizzarsi poco prima della nascita. Ogni zaffo è destinato a formare un proprio sistema di dotti circondato dal rispettivo tessuto ghiandolare. Il numero di mammelle corrisponde al numero di capezzoli, mentre il numero di ghiandole mammarie è determinato dal numero di zaffi epidermici in ciascuna mammella ed è corrispondente al numero di osti papillari presenti su ciascun capezzolo (nel cane 7-16 per capezzolo). Solitamente si formano più gemme di quante siano presenti nell'adulto, e qualora queste non regrediscono, formeranno papille (capezzoli) soprannumerarie. Le gemme mammarie si formano anche negli embrioni di sesso maschile ma regrediscono parzialmente durante lo sviluppo, dando origine a papille per lo più rudimentali (Dyce *et al.*, 2006).

Dalla nascita alla pubertà l'albero duttale rudimentale si accresce in proporzione al resto dell'organismo (crescita isometrica), mentre alla pubertà, grazie agli stimoli proliferativi degli estrogeni ovarici, si accresce in misura maggiore (crescita allometrica) (Dellmann & Eurell, 2000). Questa crescita sembra essere a carico di strutture particolari, che scompaiono nell'animale adulto: i Terminal-end-buds (TEBs). Essi sono un pluristrato di cellule strettamente addensate

situato al termine delle strutture duttali, che, mediante un processo di proliferazione, differenziazione e apoptosi cellulare attraverso il tessuto adiposo, daranno origine alle diramazioni duttali e, successivamente, ai lobuli mammari (Neville & Daniel, 1987). L'importanza degli estrogeni in questa fase di elongazione e diramazione dei dotti viene evidenziata negli studi su animali ER-deleti (*Estrogen Receptor* – deleti) in cui i TEBs risultano assenti e i dotti non riescono ad invadere il tessuto adiposo (Mallepell *et al.*, 2006). Inoltre diversi studi condotti sulla ghiandola mammaria di topo hanno messo in evidenza che le cellule più periferiche dei TEBs (le *cap cells*) costituirebbero cellule multipotenti, da cui prenderebbero origine le cellule mioepiteliali (si veda il paragrafo successivo) (Smalley & Ashworth, 2003). A partire dalla pubertà per tutto il resto della vita dell'animale ciclico, ad ogni ciclo estrale la ghiandola mammaria subirà stimoli proliferativi a carico delle strutture duttali in estro ed inizio diestro, di quelle lobulo-alveolari in tardo diestro, e ad ogni anestro ed in lattazione queste strutture andranno incontro a processi involutivi (Rehm *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010; Orfanou *et al.*, 2010). Sebbene molti fattori giochino un ruolo importante, sono gli estrogeni ed il progesterone ad avere un ruolo essenziale nella proliferazione e differenziazione cellulare epiteliale della ghiandola mammaria, con il quale gli altri fattori agiscono in concerto (Lyndon *et al.*, 1995; Korach *et al.*, 1996).

Figura 1: Rappresentazione delle caratteristiche istologiche della ghiandola mammaria durante il ciclo estrale, incluse le fasi pre-pubere e primo proestro. Da Santos et al., 2010, modificata.



TEBS: Terminal end buds.

Anatomia della ghiandola mammaria del cane

La ghiandola mammaria è una ghiandola sudoripara altamente modificata, il cui secreto ha lo scopo di fornire nutrimento ai neonati e, nei primi giorni di vita, un'immunità passiva. Essa è situata lungo la faccia ventrale del tronco, nel connettivo sottocutaneo, lungo due linee paramediane, le cosiddette linee mammarie, che nella cagna si estendono dal cavo ascellare alla regione inguinale. Più comunemente si distribuisce in 5 paia di mammelle: 2 paia toraciche, craniale e caudale (M1 e M2), 2 paia addominali, craniale e caudale (M3 e M4), 1 paio inguinali (M5) (Dyce et al., 2006; Sorenmo et al., 2011).

Istologicamente la ghiandola mammaria è una ghiandola di tipo tubulo-alveolare

composta, con secrezione apocrina e merocrina. Nell'animale adulto il suo parenchima è costituito da lobi, lobuli, e alveoli il cui secreto viene sospinto all'interno di un sistema di dotti escretori che comunicano verso l'esterno mediante il capezzolo. Tutto ciò è circondato e sostenuto da uno stroma fibrovascolare e ricco di adipociti. Partendo più superficialmente, il seno capezzolare ed il dotto capezzolare sono tappezzati da epitelio pluristratificato squamoso che si continua con l'epidermide esterna. Più in profondità l'epitelio diventa di tipo colonnare/cuboidale bistratificato che si continua nel sistema di dotti di calibro maggiore (dotti lobar, inter-lobulari), mentre diventa cuboidale semplice nelle diramazioni duttali più piccole (dotti intra-lobulari). Setti di stroma connettivale dividono il parenchima mammario in unità strutturali voluminose, i lobi, e questi a loro volta in lobuli. Questi ultimi sono costituiti da numerose unità secernenti o adenomeri di tipo alveolare. I lobuli sono anch'essi separati tra loro da setti di connettivo, che forniscono il supporto agli alveoli e contengono vasi sanguigni, linfatici, nervi e adipociti. In gravidanza e lattazione non tutti i lobuli di una stessa ghiandola sono contemporaneamente nella stessa fase secernente, pertanto in una stessa sezione istologica si possono trovare lobuli a diversi stadi del processo di secrezione, mentre gli adenomeri di uno stesso lobulo sono al medesimo stadio. Gli alveoli non secernenti sono simili ai piccoli dotti, mentre quelli secernenti variano da un epitelio cuboidale a colonnare e presentano un numero variabile di gocce lipidiche nel citoplasma ed all'interno del lume alveolare. L'eiezione del loro secreto è coadiuvato dall'importantissima azione delle cellule mioepiteliali, cellule con caratteristiche sia epiteliali sia contrattili situate attorno agli alveoli come una rete discontinua di elementi stellati localizzati tra gli alveolociti luminali e la membrana basale. Queste si contraggono sotto lo stimolo dell'ossitocina, facendo così confluire il secreto alveolare all'interno del sistema duttale. Anche i dotti lungo il loro percorso sono circondati da cellule mioepiteliali, in questa sede esse appaiono solitamente fusate e continue (Dellmann & Eurell, 2000; Sorenmo *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda l'irrorazione sanguigna, le due fonti per le tre mammelle più craniali sono l'arteria toracica laterale, cranio-lateralmente, l'arteria epigastrica superficiale craniale ed i rami delle arterie intercostali in profondità. Per le due mammelle più caudali esse sono l'arteria epigastrica superficiale caudale, superficialmente, i rami dell'arteria addominale craniale ed iliaca circonflessa

profonda, in profondità. Le vene sono satelliti. Il drenaggio linfatico delle due ghiandole più craniali è a carico del linfonodo ascellare ipsilaterale, quello delle due ghiandole più caudali è deputato al linfonodo inguinale superficiale ipsilaterale, la terza mammella (addominale craniale) è drenata da entrambi (Dyce *et al.*, 2006). Il drenaggio linfatico può tuttavia modificarsi nelle ghiandole neoplastiche (Sorenmo *et al.*, 2011) (si veda **Tabella 1**). Nel cane, a differenza del gatto, non vi è connessione vascolare tra le due file mammarie (Patsikas & Dessiris, 1996).

Tumore mammario canino

Epidemiologia

Così come nella donna, nella specie canina la neoplasia al primo posto di incidenza nelle femmine intatte è il tumore mammario (Jemal *et al.*, 2008). Per quanto nella letteratura vi siano dati in parte discordanti, si ritiene che le forme maligne nel cane, largamente rappresentate dai carcinomi, siano circa il 30-50%, e l'incidenza di mortalità è stata stimata tra il 2-20% (Moulton, 1990; Misdorp, 2002; Withrow & MacEwen, 2007). Per quanto rari studi abbiano messo in evidenza particelle virali simil-Mouse Mammary Tumour Virus (MMTV) in ghiandole sane e neoplastiche di cane, gatto e donna, l'esatta eziopatogenesi del processo cancerogenetico a carico della ghiandola mammaria non è nota (Hsu *et al.*, 2010). Diversi sono i fattori di rischio riconosciuti nella cagna, come razza, dieta, obesità, contaminanti ambientali, tra i più importanti tuttavia si riconoscono l'età e l'esposizione alla stimolazione ormonale.

L'**età** media in cui viene diagnosticata una neoplasia mammaria è tra gli 8-11 anni, con un aumento dell'incidenza già a 6 anni di età, dimostrando che nella specie canina è una malattia tipica del cane adulto/anziano. Cani di età inferiore ai 5 anni sono colpiti raramente, più frequentemente si tratta di cani che hanno ricevuto trattamenti ormonali progestinici, e più frequentemente si tratta di neoplasie benigne (Taylor *et al.*, 1976; Pérez-Alenza *et al.*, 2000; Sorenmo *et al.*, 2009).

Nel cane e nel gatto il coinvolgimento degli **ormoni steroidei** nello sviluppo di neoplasia mammaria è supportato dall'effetto protettivo dell'ovariectomia in giovanissima età e dallo sporadico sviluppo di lesioni displastiche e neoplastiche in gatti e cani trattati con progestinici (Hayden *et al.*, 1989; Thuroczy *et al.*, 2007), l'incidenza è infatti di gran lunga più elevata in quei Paesi in cui l'ovariectomia entro il secondo anno di vita non è una pratica clinica comune (Pérez-Alenza *et al.*, 2000). La neoplasia mammaria è invece rara nei soggetti in cui l'ovariectomia viene effettuata prima del primo calore e nei soggetti maschi, nei quali l'incidenza è stata stimata dello 0-2,7% e correlata alla secrezione anomala di estrogeni in presenza di neoplasia testicolare delle cellule del Sertoli (Schneider *et al.*, 1969; Brodey *et al.*, 1983; Misdorp, 2002). In medicina umana molti dei fattori di rischio

sono correlati proprio all'esposizione agli steroidi femminili: il sesso (femminile), menarca prima dei 12 anni, tarda età della menopausa, tarda età alla prima gravidanza, numero di parti, obesità in menopausa, uso di contraccettivi orali in età adolescenziale (Hulka *et al.*, 1994). In medicina veterinaria si è ricercato un possibile valore prognostico di fattori riproduttivi quali data e numero di gravidanze, pseudogavidanze, disordini dei cicli estrali, ma ad oggi sembra che nella specie canina essi non influenzino l'incidenza di neoplasia mammaria; gli studi sono tuttavia non recentissimi e probabilmente condizionati dal difficile reperimento di informazioni omogenee e dettagliate (Brodey *et al.*, 1966; Schneider *et al.*, 1969; Taylor *et al.*, 1976).

Sebbene cagne di ogni **razza** possano sviluppare una neoplasia mammaria, alcune sono maggiormente rappresentate negli studi epidemiologici, rivelando una certa correlazione tra incidenza tumorale e razza, e lasciando spazio all'ipotesi di una predisposizione genetica e quindi familiare. Le razze più rappresentate sono le razze di piccola e piccolissima taglia, quali barboncino e barboncino nano, maltese chihuahua, beagle, dachshund, West Highland white terrier, Yorkshire terrier, bichon frise; seguite da razze di taglia media come English Springer e Brittany spaniel, cocker spaniel, English setter, pointer, Afgan hound, German sheperd (Sorenmo *et al.* 2011). Tuttavia la sovra- o la sotto-rappresentazione di una razza dipende strettamente dalla composizione della popolazione canina nella regione geografica in cui è stato condotto lo studio, pertanto vi sono risultati ed opinioni discordanti riguardo l'effettiva esistenza di una predisposizione di razza (Sorenmo *et al.* 2011).

Così come in medicina umana, anche in medicina veterinaria si è trovata una correlazione tra **dieta** ed **obesità** e sviluppo di neoplasie mammarie. Secondo recenti studi (Pérez-Alenza *et al.*, 1998; Sorenmo *et al.*, 2009), animali magri a 9-12 mesi di età hanno un minor rischio di sviluppare neoplasie mammarie rispetto ai casi controllo. Al contrario, il rischio aumenta quando si tratta di animali obesi in giovane età, mentre un aumento di peso un anno prima della diagnosi di tumore non mostra alcuna significatività. Anche una dieta casalinga o ricca di grassi e carne rossa fino ad un anno prima della diagnosi è stata correlata ad una maggior incidenza di neoplasia e displasia, rispetto le diete commerciali bilanciate. È possibile che, come ipotizzato in medicina umana, anche nel cane

l'obesità influenzi il rischio di neoplasia mammaria attraverso l'innalzamento dei livelli di estrogeni liberi e l'aumento della produzione locale mediante aromatasi presenti nel tessuto adiposo (Hulka *et al.*, 1994). Il fatto che nel cane il suo effetto sia maggiore nei primi anni di vita fa pensare che in realtà sia la sinergia con l'esposizione ormonale ad essere importante, e ciò avvalorerebbe la tesi che i primi anni di vita siano l'arco di tempo in cui il tessuto mammario è più sensibile agli effetti "dannosi" dell'esposizione ormonale (Sorenmo *et al.*, 2011).

Presentazione clinica

Il segnalamento classico di un paziente affetto da neoplasia mammaria è quello di una cagna adulto-anziana, di qualsiasi razza, sessualmente intatta o che ha subito ovariectomia/ovarioisterectomia dopo il secondo anno di vita (Schneider *et al.*, 1969; Taylor *et al.*, 1976). La presentazione clinica della neoplasia consiste in noduli singoli o multipli palpabili a livello delle linee mammarie, che possono essere totalmente indipendenti per dimensione e tipo istologico (Pérez-Alenza *et al.*, 2000; Withrow & MacEwen, 2007). Il comportamento clinico varia da noduli ben circoscritti, mobili alla palpazione, con una crescita stazionaria, a noduli estesi, ulcerati, a crescita rapida e adesi ai tessuti circostanti (segno di invasione tissutale) (Pérez-Alenza *et al.*, 2000; Misdorp, 2002). Una presentazione a sé stante è quella del carcinoma mammario infiammatorio, neoplasia rara ma molto aggressiva descritta prima nella donna, e successivamente anche nel cane e nel gatto: più spesso non sono presenti noduli, ma un'estesa area eritematosa, edematosa, calda e dolente, con concomitanti segni sistemici di malattia, presentazione che può rendere difficile la distinzione con una mastite acuta grave (Illera *et al.*, 2006; Sorenmo *et al.*, 2011).

Quando la neoplasia è in grado di causare metastasi, la prima sede interessata sono i linfonodi tributari, i quali clinicamente possono mostrarsi o meno aumentati di volume. L'accertamento di un coinvolgimento dei linfonodi tributari richiede l'esecuzione di un esame citologico e/o istopatologico, e rappresenta un'informazione fondamentale per ottenere una corretta stadiazione della neoplasia (Yamagami *et al.*, 1996; Nieto *et al.*, 2000; Rasotto *et al.*, 2011). Nella valutazione di quali linfonodi possano essere coinvolti è importante tenere in considerazione che il drenaggio linfatico della mammella neoplastica è diverso da

quella sana, e possono essere coinvolti linfonodi diversi da quello ascellare ed inguinale superficiale (Patsikas *et al.*, 1996; Patsikas *et al.*, 2006). Il confronto tra il drenaggio linfatico della mammella sana e quella neoplastica viene rappresentato in *Tabella 1*.

Tabella 1: Drenaggio linfatico della ghiandola mammaria normale e neoplastica di cagna, secondo gli studi di Patsikas et al., 1996, 2006.

Ghiandola mammaria	Drenaggio linfatico normale	Drenaggio linfatico neoplastico
M1 = toracica craniale	Lnf. ascellare	Lnf. ascellare e sternale
M2 = toracica caudale	Lnf. ascellare	Lnf. ascellare e sternale
M3 = addominale craniale	Lnf. ascellare e inguinale superficiale	Lnf. ascellare, superficiale inguinale e iliaco mediale
M4 = addominale caudale	Lnf. inguinale superficiale	Lnf. inguinale superficiale e ascellare
M5 = inguinale	Lnf. inguinale superficiale	Lnf. inguinale superficiale, popliteo, vasi linfatici della faccia mediale della coscia

Lnf.: linfonodo.

Per quanto riguarda le metastasi a distanza l'organo bersaglio del tumore mammario canino è principalmente il polmone; meno frequenti ma possibili sono le metastasi in organi addominali quali fegato, reni, ghiandole surrenali, o cervello, occhi e ossa (Pérez-Alenza *et al.*, 2000).

Diagnosi e staging del tumore mammario canino

La **diagnosi** di neoplasia mammaria, nonché la differenziazione tra forma benigna e maligna ed il tipo tumorale istologico, sono fondamentali per stabilire la prognosi del paziente e quindi delineare un approccio terapeutico. Una diagnosi adeguata deve comprendere diverse valutazioni:

1. **segni clinici:** elevate dimensioni del tumore, rapida crescita, ulcerazione della cute, aderenza alla cute o ai tessuti sottostanti, aumento di volume dei linfonodi tributari, presenza di noduli/masse polmonari sono tutti parametri clinici indicatori di malignità (Hellmen *et al.*, 1993; Misdorp *et al.*, 1999).
2. **esame citologico:** sebbene possa fornire informazioni utili, spesso può risultare non diagnostico e solitamente non permette la differenziazione tra

forma benigna e maligna (Hellmen & Lindgren, 1989);

3. **esame istopatologico:** ad oggi è ancora considerata, anche in medicina umana, la metodica *gold standard* ai fini prognostici e diagnostici (Faratian, 2010). L'esame istopatologico, in aggiunta alla classificazione morfologica e al grading delle lesioni permette la rilevazione di importanti aspetti, quali:

- ◆ **dettagli morfologici cellulari:** forma e dimensioni cellulari, forma e dimensioni nucleari, numero di nuclei, aspetto della cromatina e del nucleolo, presenza/assenza di mitosi, assenza/presenza di necrosi, aspetto della membrana basale, sono tutti oggetto di osservazione. Più le cellule si presentano differenziate, cioè rassomiglianti il tipo cellulare originario, omogenee e regolari tra loro, più si depone a favore di una forma neoplastica benigna; anche la presenza di una vera capsula fibroconnettivale è solitamente indicativa di una crescita di tipo benigno. Più sono presenti invece cellule poco differenziate e/o anaplastiche (non differenziate), pleomorfe (variabili tra loro in forma e dimensione), nuclei grandi, ipercromatici, multipli, anisocariosi (variabilità di forma e dimensione tra i nuclei di diverse cellule), cellule con rapporto nucleo-citoplasma sino a 1:1 (normalmente è 1:4 o 1:6), cromatina disomogenea ed irregolare, nucleoli evidenti e/o multipli, mitosi numerose ed atipiche, necrosi, membrana basale discontinua o assente, non vi è una capsula, più la diagnosi verte verso la forma maligna. Tuttavia il problema maggiore nella diagnosi di neoplasia mammaria canina resta ancora l'identificazione delle neoplasie "veramente" maligne (metastatizzanti), sottolineando la necessità di stabilire criteri di malignità standardizzati (Goldschmidt *et al.*, 2011). I dati variabili in letteratura circa la percentuale di tumori mammari maligni nel cane suggeriscono il rischio di una soggettività nella valutazione e quindi l'influenza dell'esperienza del patologo nell'accuratezza della diagnosi.
- ◆ **invasione dei tessuti circostanti e/o linfovaskolare:** entrambi questi elementi sono indicatori di malignità, predittivi secondo alcuni autori del rischio di invasione linfatica (Rasotto *et al.*, 2011). È pertanto significativo valutarne la presenza all'esame istopatologico.

- ◆ **marginii di escissione:** un'attenta analisi dei marginii di escissione fornisce un'importante informazione prognostica. L'incompleta resezione del tumore aumenta, infatti, il rischio di recidiva (Misdorp, 2002; Robbins, 2003).

La raccolta dei dati clinici della neoplasia al momento della diagnosi riveste una grande importanza per lo **staging**. Esso ha valenza prognostica e si basa sul diametro del tumore (T), il coinvolgimento dei linfonodi regionali (confermato dall'esame citologico e istopatologico) (N), e la presenza di metastasi sistemiche (M). Allo scopo di standardizzare la raccolta di questi dati per favorire il confronto dei risultati e la comunicazione tra veterinari, sono stati sinora pubblicati dalla World Health Organization (WHO) due sistemi di staging (basati sul metodo TNM) per le neoplasie mammarie canine che mostrano alcune differenze (Owens, 1980; Rutteman *et al.*, 2001) (per i dettagli si veda in appendice I). Per quanto siano ancora necessari studi prognostici prospettici su ampia scala e con raccolta di informazioni omogenee e standardizzate che confrontino i due sistemi tra loro, alcuni autori hanno messo in evidenza il valore prognostico di alcuni stadi clinici (Yamagami *et al.*, 1996; Philibert *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005).

Classificazione e grading

L'obiettivo principale dell'esame istopatologico è quello di classificare le lesioni mammarie in diversi sottotipi istologici a scopo prognostico. Il primo tentativo di standardizzazione su scala internazionale dell'esame istopatologico risale al 1974, quando la World Health Organization (WHO) pubblicò la prima "Classificazione Istologica Internazionale dei Tumori degli Animali Domestici" (Misdorp, 1971-1973). Successivamente, una classificazione aggiornata delle neoplasie mammarie canine veniva approvata dalla WHO e pubblicata nella sezione veterinaria della Armed Force Institute of Pathology (AFIP) nel 1999 (Misdorp *et al.*, 1999; vedi appendice II). Ancora più di recente, data l'individuazione di nuovi sottotipi tumorali nel cane, è stata proposta una nuova classificazione che amplia con alcune categorie morfologiche la precedente (Goldschmidt *et al.*, 2011; vedi appendice III). A differenza della classificazione impiegata in medicina umana, quella canina si basa esclusivamente su criteri morfologici/descrittivi e non istogenetici, data l'incerta origine istogenetica del

tumore mammario canino ed il ruolo del mioepitelio, il quale è frequentemente coinvolto nella specie canina, ma non nel tumore al seno della donna (Misdorp *et al.*, 1999; Misdorp *et al.*, 2002). Ai diversi criteri morfologici sono stati associati dati di follow up in modo da dare un significato prognostico alla classificazione stessa (Misdorp *et al.*, 1999; Misdorp *et al.*, 2002).

In aggiunta alla classe istologica tumorale, altri parametri morfologici sono ritenuti di notevole rilevanza prognostica sia in medicina umana sia veterinaria (Rakha *et al.*, 2010). Alla dimensione tumorale ed allo stato linfonodale (inclusi e valutati per lo staging) si aggiunge in particolare il **grading istologico** (Rakha *et al.*, 2010). Il grading si valuta esclusivamente nei tipi tumorali maligni ed indica il grado di differenziazione della neoplasia che, anche nella specie canina, è significativamente indicatore della malignità, influenzando il tempo di sopravvivenza post-operatorio (Misdorp *et al.*, 1999; Misdorp, 2002; Karayannopolou *et al.*, 2005). Il primo sistema di grading applicato negli animali domestici si fondava sul sistema Ellston & Ellis di medicina umana (Karayannopolou *et al.*, 2005). In seguito a progressive sue modifiche, sono oggi proposti per la specie canina due sistemi di grading lievemente differenti. Il grading genericamente valuta tre parametri istologici, attribuendovi un punteggio specifico: formazione di tubuli, attività mitotica e pleomorfismo nucleare (Misdorp, 2002; Clemente *et al.*, 2010) (vedi *Tabella 2* e *Tabella 3*). Il punteggio finale, sommatoria dei tre parametri, fa ricadere la neoplasia in una delle tre categorie di grading, con progressivo aumento della malignità dal grado I (tumore ben differenziato) al grado III (tumore scarsamente differenziato). Sebbene ci siano piccole differenze tra i due sistemi di grading, non è ancora conosciuto come esse influenzino la prognosi dei tumori mammari canini, in particolare quelli diagnosticati moderatamente differenziati (grade II) (Goldschmidt *et al.*, 2011). Qualunque sistema si utilizzi, il tempo di sopravvivenza è significativamente più breve negli animali con neoplasia maligna indifferenziata (grade III) rispetto alle neoplasie ben o moderatamente differenziate (grade I e II), ed in molti studi assieme al grado III anche la presenza di invasione vascolare/linfatica e metastasi linfonodali è stata associata a prognosi infausta (Chang *et al.*, 2005; Karayannopolou *et al.*, 2005). Su uno studio condotto sulla ricerca di parametri istologici predittivi di invasione linfatica e metastasi linfonodale, il sistema di

Clemente è stato rilevato migliore come modello predittivo rispetto al sistema di Misdorp, in quanto quest'ultimo tendeva a sottostimare la malignità categorizzando un numero maggiore di carcinomi con invasione linfatica come grado I o II (Misdorp, 2002; Clemente *et al.*, 2010; Rasotto *et al.*, 2011).

Tabella 2: Sistema per il calcolo del grading istologico di malignità di Misdorp (Misdorp, 2002).

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

Tabella 3: Sistema per il calcolo del grading istologico di malignità di Clemente e collaboratori (Clemente *et al.*, 2010).

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

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

Terapia

Sia per le neoplasie mammarie benigne sia maligne la terapia d'elezione è ancor oggi la **resezione chirurgica**, ad eccezione dei pazienti con diagnosi di carcinoma infiammatorio o con metastasi sistemiche. Nel caso di masse voluminose o ulcerate con metastasi focali polmonari si può ancora optare per l'escissione chirurgica delle lesioni primarie, monitorando attentamente i parametri vitali del paziente durante l'intervento e nel periodo postoperatorio, ed affiancandola a trattamenti sistemici quali la chemioterapia (Marconato & Del Piero, 2005). Indipendentemente dalla diagnosi istopatologica, qualsiasi lesione mammaria deve essere asportata con margini ampi e profondi (almeno 2 cm in tutte le direzioni) fino alla muscolatura addominale (Marconato & Del Piero, 2005).

A seconda della distribuzione del tumore mammario, le possibili procedure chirurgiche descritte da diversi autori sono:

- Nodulesctomia: rimozione del solo nodulo mammario. Consigliabile se la neoplasia è di piccole dimensioni (< 0,5 cm), dura, superficiale, mobile.
- Mammectomia o mastectomia semplice: asportazione di una ghiandola. Proponibile se la neoplasia è localizzata al centro di questa, ha diametro maggiore a 1 cm, è parzialmente adesa ai tessuti sottostanti.
- Mastectomia regionale (Misdorp, 2002; MacEwen & Withrow, 2007): asportazione della ghiandola interessata e di quelle con drenaggio linfatico comune. Viene indicata nel caso di coinvolgimento delle mammelle addominali o inguinale.
- Mastectomia mono- o bilaterale: asportazione di una o entrambe le file mammarie. Consigliata nel caso di lesioni multiple o di diagnosi di adenocarcinoma. Se la mastectomia bilaterale è necessaria, è bene fare due mastectomie monolaterali a tre settimane di distanza per garantire la completa guarigione ed espansione tissutale.
- Asportazione linfonodale: è indicata in alcuni casi. I linfonodi ascellari sono raramente interessati e devono essere rimossi solo se aumentati di volume, non più mobili e/o positivi all'esame citologico. L'asportazione del

linfonodo inguinale e l'esame istopatologico vanno sempre effettuati qualora si asportino le ghiandole inguinali, poiché fondamentale per la stadiazione del tumore, in base alla quale si decide se considerare una chemioterapia adiuvante (Marconato & Del Piero, 2005).

In merito alle tecniche chirurgiche, la preferenza di una linea d'azione radicale contro quella conservativa è ancor oggi tema di dibattito, in quanto l'approccio aggressivo non ha registrato un miglioramento del tempo di sopravvivenza o calo di incidenza di recidive (Marconato & Del Piero, 2005; MacEwen & Withrow, 2007).

L'utilizzo della **chemioterapia** in oncologia dei piccoli animali prende spunto da sperimentazioni cliniche condotte in medicina umana, e sino a dieci anni fa nessun protocollo era risultato efficace nella cagna (Misdorp, 2002). I composti ad oggi più studiati sono la doxorubicina, ciclofosfamide e 5-fluorouracile; altri chemioterapici potenzialmente efficaci sono mitoxantrone, cisplatino e carboplatino (Marconato & Del Piero, 2005; MacEwen & Withrow, 2007). Tuttavia servono studi più approfonditi per valutare protocolli monochemioterapici o combinati più efficaci e specifici per il carcinoma canino (MacEwen & Withrow, 2007). Al momento si ritiene infatti che l'esito del trattamento chemioterapico dipenda soprattutto dalle conoscenze del veterinario oncologo sulla biologia dei tumori, dalla sua esperienza personale e la sua interpretazione dei dati disponibili in letteratura (Marconato & Del Piero, 2005). Le indicazioni per la chemioterapia sono: escissione chirurgica incompleta, evidenza istologica di invasione linfatica (neoplasia di stage 2 o 3), presenza di metastasi sistemiche, recidiva locale e tipo istologico aggressivo (carcinoma invasivo, solido, carcinosarcoma, sarcoma) (Marconato & Del Piero, 2005; MacEwen & Withrow, 2007).

La **radioterapia** è un trattamento antineoplastico locale, utilizzato per il controllo locale di tumori inoperabili o per ridurre la percentuale di recidiva. Tuttavia anche sulla reale efficacia di questa terapia adiuvante esistono dibattiti e in nessuno studio è stata riscontrata una riduzione del potenziale metastatico delle cellule neoplastiche od un allungamento del tempo di sopravvivenza dell'animale (Misdorp, 2002; MacEwen & Withrow, 2007). Può essere consigliata per il controllo del dolore in presenza di metastasi ossee e sindromi compressive midollari, mantenendo sempre la prognosi di tipo sfavorevole (Marconato & Del

Piero, 2005).

La **terapia ormonale** consiste nella manipolazione della fisiologia ormonale della cagna per eliminare l'effetto proliferativo degli ormoni ovarici. L'ovariectomia ne è un esempio, ma sinora molti studi non hanno dimostrato alcun effetto terapeutico nell'attuarela in concomitanza della mastectomia (Schneider *et al.*, 1969, Yamagami *et al.*, 1996). Il suo ruolo è piuttosto di tipo preventivo se effettuata prima del primo calore, o comunque, anche se in misura minore, entro il secondo anno di età (Schneider *et al.*, 1969; Taylor *et al.*, 1976) (si veda per ulteriori dettagli il successivo capitolo "Ovariectomia e ovarioisterectomia: effetti sulla mammella"). Nei tumori ER-positivi (*Estrogen receptor-positivi*) si può antagonizzare l'azione degli estrogeni endogeni mediante l'utilizzo di farmaci antiestrogeni. Il più utilizzato in medicina umana è il tamoxifene, farmaco non steroideo di sintesi che compete con gli estrogeni per il recettore citoplasmatico, ed una volta nel nucleo arresta il ciclo cellulare delle cellule entrate in fase G₁ (Doisneau-Sixou *et al.*, 2003). In oncologia umana esso trova applicazione nel trattamento adiuvante di carcinomi mammari ER-positivi metastatici in donne in menopausa, e del carcinoma dell'endometrio in fase avanzata. In medicina veterinaria la valutazione dell'espressione recettoriale delle neoplasie mammarie non è ancora pratica di routine ed i risultati in merito all'utilizzo del tamoxifene sono ancora scarsi e controversi (Marconato & Del Piero, 2005). È stata accertata comunque una residua attività estrogenica del tamoxifene, che causa endometrite e piometra nelle cagne intere, segni clinici di estro in quelle non intere. Pertanto i candidati per la terapia con tamoxifene sarebbero cagne con tumori ER-positivi e che hanno subito un'ovarioisterectomia (Marconato & Del Piero, 2005; MacEwen & Withrow, 2007).

Molti tumori umani, tra cui il tumore al seno, mostrano un'aumentata espressione delle ciclossigenasi-2 (COX-2). Recentemente la loro espressione è stata dimostrata anche in diversi tumori del cane e del gatto, ed è possibile una correlazione con la sovraespressione del proto-oncogene HER-2/neu (Millanta *et al.*, 2006). L'utilizzo di farmaci antinfiammatori anti-Cox-2 a scopo antitumorale è ancora in fase di studio, ma alcuni risultati interessanti stanno emergendo in topi transgenici, in cui farmaci selettivamente inibitori delle Cox-2 ritardano la comparsa del tumore mammario (Chang *et al.*, 2004).

Estrogeni e Progesterone

Produzione e funzioni fisiologiche

Gli estrogeni ed il progesterone sono ormoni di origine lipidica (steroidi) prodotti nelle ovaie a partire dalla pubertà, per questo sono definiti come ormoni sessuali femminili. Il termine **estrogeno** deriva dalla capacità di indurre l'estro dopo somministrazione nelle femmine puberi. Sono gli estrogeni, infatti, i responsabili del comportamento estrale negli animali ciclici, e, alla pubertà, dello sviluppo delle caratteristiche degli organi genitali femminili e delle strutture sessuali secondarie (conformazione dell'organismo, distribuzione dell'adiposità, caratteristiche del mantello, ecc.). L'estrogeno ad azione più rilevante è il 17- β -estradiolo (17- β -E₂ o E₂), seguito dal suo stereoisomero α -estradiolo (17- α -estradiolo), e l'estrone (E₁). L'estradiolo è un ormone molto potente ed agisce a piccolissime dosi, dell'ordine di grandezza dei picogrammi. Essi sono prodotti durante la fase follicolinica ovarica, da parte delle cellule della granulosa del follicolo stimulate dalle gonadotropine ipofisarie (ormone follicolo-stimolante e luteinizzante), e raggiungono il picco di concentrazione nella fase estrale del ciclo. In generale essi svolgono su tutto l'apparato riproduttore un'azione iperemica, iperplastica ed ipertrofica e svolgono un'importante funzione anche al parto, per la loro azione mioeccitatoria uterina e preparatoria all'effetto di altri ormoni come l'ossitocina, le prostaglandine e la relaxina (Aguggini *et al.*, 2006). Nella donna, oltre che per il sistema riproduttore, sono molto importanti anche per il normale funzionamento del sistema cardiovascolare, per il metabolismo osseo e per lo sviluppo neuronale assieme al progesterone (Mallepell *et al.*, 2006; Finocchi & Ferrari 2011). Il **progesterone** (P₄) è uno steroide a 21 atomi di carbonio (Δ^4 pregnene-3,20-dione), il cui nome deriva dalla sua funzione di preparazione e mantenimento della gravidanza. Esso viene prodotto dalle cellule del corpo luteo durante la fase luteinica ovarica sotto lo stimolo dell'LH (ormone luteinizzante), divenendo l'ormone predominante durante la fase di diestro del ciclo estrale ed in gravidanza. Le concentrazioni a cui agisce sono più elevate rispetto a quelle degli estrogeni, dell'ordine dei nanogrammi. Le sue azioni *progestiniche*, cioè a favore del mantenimento della gravidanza, consistono nel diminuire la contrattilità spontanea delle cellule miometrali (aumentandone il

potenziale di membrana) e diminuirne la sensibilità all'ossitocina, promuovere la secrezione del latte uterino delle ghiandole endometriali (stimolate a proliferare precedentemente dagli estrogeni), svolgere un effetto immunosoppressivo nell'ambiente uterino a protezione del conceptus, promuovere la formazione del tappo cervicale, e portare a completo sviluppo la componente alveolare della ghiandola mammaria, mediante un'azione trofica complementare a quella degli estrogeni svolta precedentemente la gravidanza. Per espletare appieno le sue azioni fisiologiche, infatti, il progesterone necessita che i tessuti abbiano precedentemente subito l'azione degli estrogeni (Aguggini *et al.*, 2006).

Il meccanismo d'azione è quello comune agli ormoni steroidei: essendo lipofili, entrano nella cellula attraverso diffusione passiva e trasporto attivo e nel citoplasma si legano a recettori ER (*Estrogen Receptor*) e PR (*Progesterone Receptor*) citoplasmatici. Mediante questi vengono trasportati nel nucleo dove si legano a recettori nucleari che in realtà sono fattori di trascrizione ligando-indotti: con questi formano un complesso ormone-recettore che modula la trascrizione genica di una specifica sequenza di DNA di un gene promotore del ciclo cellulare (Mallepell *et al.*, 2006).

Estrogeni e progesterone e la ghiandola mammaria

Gli estrogeni ed il progesterone sono i principali fattori del corretto sviluppo e differenziazione del tessuto ghiandolare mammario, senza i quali esso non sarebbe possibile (Lyndon *et al.*, 1995; Korach *et al.*, 1996). A partire dalla pubertà gli estrogeni stimolano il sistema duttale rudimentale a proliferare, per formare un albero duttale complesso attraverso il tessuto adiposo della ghiandola, che trova il suo massimo sviluppo nella fase estrale di ogni ciclo, mentre va in regressione a partire dalla seconda metà del diestro e durante l'anestro, quando gli estrogeni sono a livelli molto bassi. Il progesterone è il responsabile dello sviluppo alveolare che avviene in gravidanza ed in diestro, quando i suoi livelli sono elevati. Esso è massimale durante la gravidanza, mentre va incontro a regressione durante la lattazione ed in anestro (Rehm *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010; Orfanou *et al.*, 2010). L'importanza di questi ormoni è stata messa in evidenza mediante studi su animali *knock-out*: nei topi PR-deleti (Progesterone receptor-deleti) viene totalmente a mancare il normale sviluppo lobulo-alveolare caratteristico della gravidanza ed essenziale per la lattazione,

dimostrando che anche se altri fattori, tra cui la prolattina, agiscono in concerto, è il progesterone ad avere il ruolo essenziale (Sutherland *et al.*, 1998). L'azione degli estrogeni dipende fortemente dalle loro isoforme recettoriali: sono principalmente due i recettori nucleari attraverso i quali gli estrogeni svolgono la loro azione proliferativa, l'ER α e l'ER β . Entrambi sono presenti nella ghiandola mammaria, ed attraverso prove di delezione su topi ne è emerso un ruolo differente: la delezione di ER β interferisce con la differenziazione terminale della ghiandola mammaria, ma non con la crescita duttale; la delezione di ER α si associa invece all'incapacità proliferativa del sistema duttale rudimentale in assenza dei TEBs (Terminal End Buds) che non riesce a proliferare (Mallepell *et al.*, 2006). I recettori ER α sono presenti anche nello stroma mammario, e, anche se non si ha piena comprensione del meccanismo, sembra che anche lo stroma rivesta un ruolo importante per lo sviluppo mammario, che avverrebbe attraverso una comunicazione di tipo paracrino tra ER, EGFR (recettore del fattore di crescita epiteliale) e FGFR (recettore del fattore di crescita fibroblastico) (Mallepell *et al.*, 2006). Come già precedentemente affermato, il normale controllo dello sviluppo e differenziazione della ghiandola mammaria è complesso e coinvolge interazioni tra estrogeni e progesterone, ma anche tra altri ormoni sistemici (soprattutto prolattina e glucocorticoidi), fattori di crescita locali e citochine. È interessante notare che un ambiente ormonale simile sia necessario anche per la carcinogenesi mammaria. (Sutherland *et al.*, 1998).

Il numero di ER e PR è influenzato dalla concentrazione degli stessi ormoni: gli estrogeni inducono la formazione di ER e PR, mentre il progesterone la diminuisce di entrambi (Hulka *et al.*, 1994).

Ruolo nella cancerogenesi mammaria

Il concetto che gli ormoni potessero aumentare l'incidenza di neoplasia è stato sviluppato per primo da Bittner e collaboratori nel 1948, mediante studi sperimentali su estrogeni e neoplasia mammaria condotti su topi. Questo concetto, ridefinito poi da studi successivi, consiste nel fatto che un'iperstimolazione ormonale, in assenza di altri iniziatori esterni, quali sostanze chimiche o radiazioni ionizzanti, produce negli organi responsivi (utero e mammella) una proliferazione cellulare che progredisce da normale ad iperplastica a neoplastica (Henderson *et al.*, 1988). Allo scopo di individuarne il

meccanismo eziopatogenetico ed eventuali indicatori prognostici, la ricerca in medicina umana si è focalizzata prevalentemente sugli estrogeni, per i quali è riconosciuto il ruolo predominante nella stimolazione della proliferazione epiteliale mammaria in vitro ed in vivo; mentre i progestinici rivestono un ruolo sia stimolatore sia inibitore sulla proliferazione delle cellule neoplastiche, ed in vitro l'effetto inibitorio sembra essere quello preponderante (Musgrove *et al.*, 1991; Sutherland *et al.*, 1998). Uno dei meccanismi alla base dell'effetto inibitore del progesterone sembrerebbe legato al metabolismo degli estrogeni: nel tessuto mammario neoplastico il progesterone è in grado di aumentare l'attività enzimatica dell'enzima che converte l'estradiolo in estrone, la 17 β -idrosteroidodeidrogenasi, limitando così la produzione dell'estrogeno cruciale nella progressione neoplastica (Hulka *et al.*, 1994).

In diversi studi relativi all'attività estrogenica è emerso che l'isoforma recettoriale con cui gli estrogeni esprimono la loro azione cancerogenetica in particolare sia l'ER α , che, di conseguenza, è stato ampiamente studiato per il suo valore prognostico sia in medicina umana sia in veterinaria (Gerdes *et al.*, 1987; Nieto *et al.*, 2000; Allred, 2010). L'estradiolo stimola la proliferazione di colture di cellule mammarie neoplastiche esprimenti il recettore ER α , legandosi con elevata affinità e specificità al recettore. Il recettore ER β , oltre a richiedere una maggior concentrazione ormonale, su cellule mammarie neoplastiche xenotrapiantate in topi agisce come inibitore della proliferazione cellulare. Infatti, la sua concentrazione nella ghiandola mammaria della donna è elevata nel tessuto sano e bassa nelle lesioni proliferative, così come il rapporto ER β :ER α , suggerendo un effetto protettivo del recettore ER β nei confronti dell'attività mitogenica del recettore ER α , ed una possibile azione di soppressore tumorale (Sahab *et al.*, 2011). Per comprendere il meccanismo d'azione mediante il quale gli estrogeni inducano una proliferazione di tipo neoplastico, si è studiato come essi intervengano nella progressione del ciclo cellulare: in cellule endometriali e mammarie di topi in vivo, gli estrogeni promuovono la proliferazione cellulare reclutando cellule quiescenti ad entrare nel ciclo cellulare, ed accorciano la fase G1 in quelle già ciclanti (Schmitt, 1995; Sutherland *et al.*, 1998). Sia gli estrogeni sia gli antiestrogeni esplicano la loro maggior azione sulle cellule che si trovano nella fase iniziale di G1 (Doisneau-Sixou *et al.*, 2003). Vi sono numerose evidenze che l'effetto induttore di proliferazione neoplastica degli estrogeni

sarebbe aumentato, anziché inibito, dall'azione progestinica (Hulka *et al.*, 1994). Ciò verrebbe in parte spiegato dal loro ruolo nella progressione del ciclo cellulare: in colture di cellule mammarie neoplastiche, il progesterone ad una prima fase accelera il passaggio dalla fase G1 alla fase S, poi invece lo rallenta, sincronizzando tutte le cellule nella prima fase di G1 del ciclo successivo. Il suo scopo sarebbe quello di inibire la proliferazione per stimolare la differenziazione, ma ciò in prima istanza produce una prima ondata proliferativa, ed in seconda sincronizza le cellule nella fase in cui sono più suscettibili agli estrogeni, favorendo così la progressione neoplastica (Musgrove *et al.*, 1991; Sutherland *et al.*, 1998). Le apparenti contraddizioni sugli effetti del progesterone vengono inoltre in parte spiegate da un modello recentemente proposto in cui viene sottolineata l'importanza dei diversi metaboliti derivanti dal progesterone: questi agirebbero come ormoni indipendenti con azioni opposte sul ciclo cellulare, sull'apoptosi e sull'interazione con molecole citoscheletriche e di adesione. In particolare il 3 α -diidrossiprogheterone (3 α HP) sembra inibire la proliferazione ed il distacco delle cellule mammarie favorendo così una condizione di normalità, mentre il 5 α -diidrossiprogheterone (5 α HP), avendo effetti diametralmente opposti, sostiene la crescita tumorale e potenzialmente favorisce il processo di metastatizzazione (Wiebe, 2006). Sebbene il ruolo di induttori neoplastici sia ormai ampiamente riconosciuto ad entrambi gli ormoni sessuali, l'esatto meccanismo molecolare con cui la proliferazione diventi di tipo neoplastico rimane ancora sotto studio e si sono sollevate diverse ipotesi. I geni coinvolti nell'induzione della progressione del ciclo cellulare da parte del complesso ormone-recettore sono più probabilmente c-Myc e cyclin D1, con conseguente attivazione di Cdk4. Il loro ruolo centrale suggerisce che una loro espressione aberrante possa contribuire ad alterare la sensibilità agli steroidi con conseguenti effetti sull'evoluzione, il fenotipo e la prognosi del tumore mammario (Sutherland *et al.*, 1998). A sua volta l'esistenza di varianti recettoriali ER e PR con funzioni aberranti comporterebbe un'anormale trascrizione dei suddetti geni (Hulka *et al.*, 1994). Secondo altri autori i normali effetti proliferativi degli ormoni comporterebbero una progressione da tessuto sano a iperplasia a neoplasia, i fenotipi maligni sarebbero il frutto di errori nei meccanismi della divisione cellulare (errori nella copia di DNA, traslocazioni cromosomiali ecc.) (Henderson *et al.*, 1988).

Indipendenza ormonale e valore prognostico

Numerosi studi in medicina umana hanno dimostrato che l'espressione recettoriale nel tumore è inversamente correlata al grado di malignità e alla proliferazione cellulare (Fisher *et al.*, 1987; Gerdes *et al.*, 1987; Rutteman *et al.*, 1988). Secondo tali osservazioni, i tumori più differenziati subiscono il controllo regolatorio degli ormoni e proliferano di meno, mentre al progredire del tumore verso la malignità, la sua dipendenza ormonale diminuisce e la proliferazione cellulare aumenta (Gerdes *et al.*, 1987; Geraldles *et al.*, 2000). Per tale motivo in medicina umana la valutazione immunohistochimica del marcatore di proliferazione Ki-67 e del recettore ormonale ER α viene effettuata di routine nei casi di tumore al seno, essendo ben conosciuto il valore prognostico di entrambi (Gerdes *et al.*, 1991; Snead *et al.*, 1993; Geraldles *et al.*, 2000). La necessità di indagare l'espressione di PR è dovuta al fatto che un certo numero di tumori ER-positivi (ER+) non rispondono alla terapia ormonale. La proliferazione cellulare è infatti più elevata in quei tumori maligni che hanno bassa espressione di PR (Geraldles *et al.*, 2000) ed il fallimento della terapia anti-estrogeni nei tumori umani ER+ potrebbe essere attribuita alla mancanza di PR. I tumori positivi ad entrambi i recettori hanno infatti una miglior risposta alla terapia (Allred *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 2006).

Diverse sono le teorie che cercano di spiegare come le cellule neoplastiche possano perdere la dipendenza ormonale e acquisire una maggiore capacità proliferativa, ma la reale causa è tutt'oggi sconosciuta. Secondo Schmitt (1995) riarrangiamenti o delezioni nei geni che trascrivono i recettori steroidei possono produrre recettori che stimolano l'espressione dei geni responsivi agli steroidi, anche in assenza degli ormoni stessi (Cardazzo *et al.*, 2005). Le cellule con queste varianti recettoriali, potenzialmente responsabili dei falsi negativi ad alcune indagini di espressione, sarebbero in grado di proliferare come se cronicamente stimulate dagli estrogeni (Schmitt, 1995). Secondo altri autori le cellule con fenotipo ER-negativo (ER-) diventerebbero in grado di bypassare l'utilizzo degli estrogeni come agente mitogeno, utilizzando invece i fattori di crescita, come apparentemente dimostrato dall'associazione tra uno stato ER- e una sovraespressione di fattore di crescita epiteliale EGF (Dickson & Lippman, 1986; Mallepell *et al.*, 2006). Similmente, infatti, anche l'amplificazione

dell'oncogene HER-2/neu (Human Epidermal growth factor Receptor-2) sembrerebbe essere associata alla negatività recettoriale steroidea e ad una diagnosi sfavorevole nei cancri al seno invasivi (Hulka *et al.*, 1994). Secondo una teoria recente, inoltre, le alterazioni dell'espressione nelle cellule ER α - potrebbero avere il ruolo di promuovere un fenotipo più maligno delle cellule ER α + adiacenti, caratterizzato da: inibizione dell'apoptosi, ridotta differenziazione, aumento del danno al DNA, del potenziale metastatico e della resistenza alla chemioterapia (Sahab *et al.*, 2011). Quali siano le cause o i fattori predisponenti una conversione dello stato recettoriale verso la negatività dei fenotipi tumorali maligni è tutt'oggi sconosciuto. Alcuni autori in medicina umana hanno evidenziato un'associazione tra l'uso prolungato ad alte dosi di estrogeni esogeni e lo stato tumorale ER- (Hulka *et al.*, 1994).

Ovariectomia ed ovarioisterectomia: effetti sulla mammella

Da anni l'ovariectomia e l'ovarioisterectomia sono considerate tecniche protettive nei confronti del tumore mammario canino. Secondo un importante studio di Schneider e collaboratori (1969), cagne sottoposte ad ovariectomia od ovarioisterectomia prima del primo anno di età hanno un rischio dello 0,5% di sviluppare neoplasie mammarie, tra il primo ed il secondo ciclo un rischio dell'8%, dopo il secondo ciclo del 26%; mentre non vi è alcuna differenza di incidenza tra animali interi e quelli ovariectomizzati dopo il secondo anno di vita (Taylor *et al.*, 1976). Ciò ha fatto supporre che l'effetto benefico dell'asportazione delle gonadi femminili fosse di tipo dose-dipendente: l'effetto sarebbe chiaramente maggiore in quei pazienti con nessuna o minima esposizione agli ormoni ovarici, e diminuirebbe piuttosto rapidamente entro i primi 2 anni di vita, suggerendo così che gli eventi cruciali che predispongono la cagna allo sviluppo di tumore mammario avvengano molto presto nella sua vita (Sorenmo *et al.*, 2011). Anche se con incidenza nettamente inferiore, anche i pazienti non interi possono sviluppare una neoplasia mammaria ed in molti studi non è stato registrato un maggior tempo di sopravvivenza di questi rispetto i soggetti interi (Schneider *et al.*, 1969; Brodey *et al.*, 1966; Yamagami *et al.*, 1996). Questi risultati possono essere dovuti al fatto che non è stata valutata l'espressione recettoriale del tumore, pochi erano casi ER+, o non si conosceva a quando risaliva l'ovariectomia (Sorenmo *et al.*, 2000). Esiste, infatti, una relazione tra

l'espressione recettoriale tumorale e lo stato ormonale della cagna: un ambiente povero di estrogeni (animale non intero) favorirebbe la crescita dei subcloni neoplastici ER-; un ambiente ricco di estrogeni (animale intero) favorirebbe invece i subcloni ER+. Un cane quindi che rimane intatto fino all'escissione chirurgica della neoplasia, secondo questa ipotesi, avrebbe una maggior probabilità di avere un tumore ER+, e quindi di poter godere dei benefici di una terapia ormonale; al contrario, un animale che non ha mai subito l'azione degli estrogeni svilupperà più probabilmente tumori ormono-indipendenti (Sorenmo *et al.*, 2000). Se sinora non si è mai riscontrato un effetto protettivo dell'ovariectomia concomitante alla mastectomia, la conoscenza dell'espressione recettoriale tumorale potrebbe far emergere un suo effetto protettivo retroattivo: nello studio di Sorenmo e collaboratori (2000) animali ovariectomizzati al momento della chirurgia del tumore o entro due anni da essa hanno registrato tempi di sopravvivenza più lunghi rispetto ai soggetti interi o ovariectomizzati almeno due anni prima della comparsa del tumore (Schneider *et al.*, 1969; Taylor *et al.*, 1976; Misdorp, 2002). Da ciò emerge che nel caso in cui l'ovariectomia non sia stata effettuata entro il secondo ciclo estrale dell'animale, sarebbe forse consigliabile non effettuarla sino al momento dello sviluppo di una neoplasia mammaria, dando così una chance in più alla neoplasia di esprimere i recettori ormonali ed essere rispondente alla terapia antiestrogenica (Sorenmo *et al.*, 2000).

Studi immunoistochimici di ER e PR nel tumore mammario

Diversi studi hanno investigato l'espressione dei recettori per estrogeni e progesterone nel tumore mammario canino. Tali studi hanno utilizzato tecniche, protocolli immunoistochimici e sistemi di valutazione semiquantitativa differenti. Pertanto i dati di espressione sono variabili e difficilmente raffrontabili. Brevemente, si è evidenziato che il tessuto sano contiene un maggior numero di recettori rispetto al tessuto neoplastico benigno e maligno, e che quest'ultimo, in particolare, presenta medie di espressione recettoriale più basse (Rutteman *et al.*, 1988; Nieto *et al.*, 2000; Millanta *et al.*, 2005; Thuroczy *et al.*, 2007). Alcuni autori hanno riscontrato una correlazione inversa tra età, diametro del tumore, grading istologico, sterilizzazione, metastasi linfonodale, invasione linfatica, indice mitotico ed espressione recettoriale di ER α e/o PR (Nieto *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2009). Sebbene siano pochi i tipi istologici

indagati nei diversi studi, il carcinoma anaplastico ed il carcinoma solido rappresentano sinora quelli a minor positività recettoriale (Nieto *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005).

Esistono delle differenze rilevanti nell'espressione recettoriale di cane, gatto e donna: caratteristico del gatto è l'elevato numero di casi ER- rispetto al cane e alla donna, dato che sembra suggerire una minor dipendenza ormonale del tumore mammario felino rispetto alle altre specie; sull'espressione media di PR vi sono pareri discordanti, ma il fenotipo PR+ sembra essere più frequente del fenotipo ER+ (Hamilton *et al.*, 1976; Martin *et al.*, 2002; Millanta *et al.*, 2005). Mediamente più del 50% dei tumori mammari canini esprimono il recettore ER e/o PR suggerendo che il tumore mammario canino avrebbe caratteristiche in comune con il cancro al seno ormono-dipendente (MacEwen *et al.*, 1982; Van Zwieten, 1984; Rutteman *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005). La mancanza di ER nel gatto potrebbe spiegare la sua maggior aggressività (Millanta *et al.*, 2005). Nel tumore al seno primario della donna si trovano frequentemente livelli recettoriali anche più elevati rispetto alla specie canina e frequentemente le metastasi sono positive ai recettori ormonali (Vihko *et al.*, 1980; Wittliff, 1984; Rutteman *et al.*, 1988). Al contrario, nel cane gli emboli metastatici sono stati osservati prevalentemente negativi; pertanto si suppone che nel tumore mammario canino la perdita dei recettori ormonali avvenga prima che nel tumore al seno della donna (Rutteman *et al.*, 1988).

Sono ancora pochi gli studi che indagano il valore prognostico di ER α e PR in medicina veterinaria. Nello studio di Nieto e collaboratori (2000) è stato confermato il valore prognostico di ER α nel tumore mammario canino; mentre nello studio di Martin e collaboratori (2005) il valore prognostico di ER α e PR è risultato dipendente dal grading istologico e dal diametro tumorale (Nieto *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005). In altri studi sul tumore mammario canino e felino non è stata riscontrata una relazione tra espressione recettoriale e tempo di sopravvivenza a causa dello scarso numero di animali deceduti, di tumori con fenotipo negativo, o, al contrario, di tumori con fenotipo positivo (Millanta *et al.*, 2005; Illera *et al.*, 2006; Toniti *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2009).

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro comprende la valutazione dell'espressione dei recettori per estrogeno α e progesterone nel tessuto ghiandolare mammario normale e neoplastico della specie canina.

In particolare, mediante tecniche di immunistochemica, si vuole indagare la positività recettoriale in diverse classi istologiche di tumore mammario canino, tra cui sottotipi tumorali di recente identificazione (Goldschmidt *et al.*, 2011) (si veda appendice).

In aggiunta, in questo studio, la valutazione dell'espressione dei recettori ormonali vuole prendere in considerazione due sottopopolazioni canine selezionate, rispettivamente di soggetti interi e non interi. Tale confronto è mirato allo scopo di evidenziare differenze in termini di percentuale ed intensità di espressione recettoriale in base allo stato riproduttivo dei soggetti.

Ancora, si considera la valutazione di eventuali relazioni tra l'espressione dei recettori e i dati anamnestici, istopatologici e di follow up dei soggetti a fini prognostici.

MATERIALI E METODI

Campioni e raccolta dati Follow up

In questo studio sono stati analizzati 113 campioni di neoplasia mammaria canina provenienti da soggetti di sesso femminile e archiviati presso il Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova, area di anatomia patologica, che derivano dalla routinaria attività diagnostica offerta dal laboratorio del Dipartimento. I campioni vengono inviati fissati in formalina tamponata al 10% (formaldeide al 4%), in laboratorio vengono processati entro 48 ore dalla registrazione ed inclusi in paraffina. Mediante l'utilizzo del microtomo, vengono ottenute sezioni di 4 µm di ciascun campione, che vengono successivamente colorate con ematossilina e eosina (H&E) secondo le procedure standard, per permetterne una valutazione morfologica delle lesioni al microscopio ottico. In accompagnatoria, per ciascun campione, vengono forniti alcuni dati riguardanti l'anamnesi e l'esame clinico effettuato dalle strutture private da cui proviene il campione. Tali dati sono stati integrati mediante intervista telefonica e apposito modulo cartaceo attraverso i quali sono state inoltre raccolte informazioni di follow up, ad almeno un anno dopo la diagnosi, relative allo stato clinico del soggetto e comparsa di recidive e/o metastasi.

I campioni di questo studio sono stati selezionati tra i casi di neoplasia mammaria canina dell'attività diagnostica di un periodo di 5 anni, intercorso tra il 2005 e il 2009. La selezione prevede che un campione corrisponda ad un unico paziente: nei pazienti con lesioni multiple di neoplasia mammaria si è considerato esclusivamente il tipo istologico classificato più maligno. Sono stati selezionati gruppi istopatologici specifici e due sottopopolazioni canine quantitativamente raffrontabili di soggetti rispettivamente interi e non interi.

Esame istopatologico

L'esame istopatologico dei campioni è stato effettuato su sezioni colorate con ematossilina eosina e le lesioni sono state classificate sulla base della recente classificazione WHO-modificata (Goldschmidt *et al.*, 2011) (vedi appendice). Il grading delle lesioni maligne è stato effettuato secondo il sistema di Clemente e

collaboratori (2010) (vedi *Tabella 3*), e per ogni campione sono stati raccolti e valutati separatamente i seguenti parametri: età del soggetto, razza, stato riproduttivo (soggetto intero o non intero e, se possibile, momento della sterilizzazione), età alla diagnosi di neoplasia, numero delle lesioni, diametro della lesione più grande, presenza/assenza di cellule neoplastiche ai margini di escissione, presenza/assenza di invasione linfatica, indice mitotico.

Esame immunoistochimico

Tecnica e strumenti

La tecnica di colorazione immunoistochimica è attualmente la tecnica d'elezione per indagare la presenza ed effettuare una valutazione semiquantitativa dei recettori per estrogeni e progesterone su un campione di tessuto. Essa sfrutta la formazione di complessi antigene-anticorpo che vengono evidenziati con un colorante specifico, e rispetto le metodiche precedenti ha il vantaggio di mantenere la stratigrafia del tessuto e pertanto di poter localizzare ed individuare le cellule in cui è avvenuta la reazione.

In questo studio per indagare e quantificare la presenza dei recettori per estrogeni e progesterone si è eseguita su tutti i campioni un'analisi immunoistochimica su sezioni di 3 micron di spessore su vetrini portaoggetti Superfrost® utilizzando un immunocoloratore automatico BenchMark XT® (VentanaMedical System). L'immunocoloratore ha impiegato per la rivelazione l'ultraView™ DAB (HRP) kit, un sistema biotina-free basato sull'utilizzo di un multimerico complessato all'enzima perossidasi Horseradish che permette di identificare in modo sensibile gli anticorpi primari di topo e coniglio. Il kit è costituito da cinque componenti: ultraView™ Universal DAB Inhibitor (che impedisce un'aspecifica perossidazione della DAB), ultraView™ Universal DAB HRP Multimer (multimerico biotina free complessato con la perossidasi Horseradish), 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. La macchina permette la colorazione automatica di 30 sezioni contemporaneamente. Ognuna delle postazioni occupate dal vetrino è

indipendente dalle altre e permette di effettuare colorazioni con anticorpi e protocolli diversi all'interno della stessa corsa di colorazione. Durante tutta la procedura i vetrini erano ricoperti da una soluzione oleosa per creare una camera umida sul tessuto ed i reagenti sono stati distribuiti automaticamente. L'unica operazione manuale è stata la titolazione dell'anticorpo primario (100 microlitri di soluzione con diluizione specifica a seconda del marcatore indagato). La controcolorazione è stata effettuata, sempre in modo automatizzato, con ematossilina di Mayer per 4 minuti. Al termine della corsa i vetrini sono stati accuratamente lavati in acqua e sapone per eliminare la soluzione oleosa e successivamente disidratati attraverso passaggi di due minuti ciascuno in soluzioni ascendenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100%) ed in xilene 100%; infine i vetrini sono stati montati con Eukitt® (Bio-Optica).

Anticorpi e Protocolli

Come marcatore di recettori degli estrogeni è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale mouse anti-human ER codice NCL-ER α -LH₂ clone LH₂, prodotto da Novacastra Uk, in diluizione 1:30. Come marcatore dei recettori del progesterone, invece, l'anticorpo monoclonale mouse anti-human PR codice IM-1546 clone 10A6, prodotto da Immunotech, in diluizione 1:80. Come controllo positivo sono state utilizzate sezioni di utero, ovaio e ghiandola mammaria sana di specie canina e come controlli negativi sezioni di tumore mammario canino in cui è stato omesso l'anticorpo primario, sostituito da soluzione diluente (Antibody Diluent, Ventana Benchmark). Le fasi principali dei protocolli utilizzati vengono riassunti in **Tabella 4**.

Tabella 4: Schema delle fasi principali dei protocolli immunoistochimici di ER α e PR.

Marcatori	Smascheramento	Incubazione anticorpo	Ultrawash
ERα	60 minuti a 98°C	Temperatura ambiente 60 minuti	sì
PR	60 minuti a 98°C	Temperatura ambiente 60 minuti	sì

ER α : recettore estrogenico α ; PR: recettore progestinico.

Valutazione della positività

La valutazione della positività alla colorazione immunohistochimica è stata effettuata mediante osservazione al microscopio ottico della percentuale di cellule epiteliali che presentavano i nuclei di colorazione brunastra. A questo scopo si sono contate 100 cellule per ogni campo su almeno 10 campi microscopici all'obiettivo 40X, per un totale di 1000 cellule. Tale conta è stata effettuata separatamente per il tessuto neoplastico ed il tessuto sano circostante di ogni campione, per un totale di due conte per ciascun campione. Si è inoltre espressa una valutazione soggettiva relativa all'intensità della colorazione dei nuclei delle cellule neoplastiche secondo 5 gradi di intensità, ponendo come colorazione intensa (grado 5) di riferimento quella del tessuto sano del campione in osservazione. Qualora il tessuto neoplastico presentasse eterogeneità di intensità di espressione, si è considerata l'intensità prevalente. La positività nucleare è stata esclusivamente valutata nelle cellule epiteliali ghiandolari. Eventuali aspecifici citoplasmatici sono stati considerati come tali e non inclusi nello studio. Per la distinzione tra campione positivo e negativo non si è stabilito un *cut-off* negativo, ma si sono utilizzati i dati puri.

Analisi statistica

Sono state condotte analisi statistiche con il *software* SAS (*Statistical Analysis System*). Per investigare le relazioni tra le tipologie di lesione (iperplasia, epiteliosi, tumori benigni, tumori maligni), i sottotipi tumorali (tumori semplici, tumori complessi, e tipi istologici), la distribuzione istologica dei tumori (nodulo singolo/multiplo), il grado istologico di malignità, le informazioni segnaletiche dell'animale (età, sterilizzazione, diametro tumorale) e i valori di percentuale ed intensità di espressione di ER α e PR, sono state condotte analisi della varianza sulla base di un modello lineare. Venivano prese in considerazione quali fonti di variabilità della percentuale ed intensità di espressione recettoriale l'età, la presenza/assenza di sterilizzazione, la tipologia di lesione, il sottotipo tumorale, la distribuzione istologica delle lesioni. Per ciascuna variabile esplicativa di natura categorica sono state calcolate le medie dei minimi quadrati (medie *least-squares*).

Per l'analisi dei dati di follow up sono stati effettuati studi di associazione basati

su tavole di frequenza e test di associazione utilizzando statistiche del Chi quadrato (*Chi square*). Per tutte le analisi statistiche, la significatività utilizzata è pari a 5%.

RISULTATI

Dati anamnestici e follow up

La popolazione canina oggetto del presente studio è costituita da 113 cani di sesso femminile. L'età dei soggetti varia tra 3 e 15 anni, l'età media è di 9,4 anni ($9,4 \pm 2,61$). Di 6 animali non si conosce l'età e sono stati esclusi da questo calcolo. Il 51,33% (58 su 113) sono animali interi, il 48,67% (55 su 113) sono animali non interi. Non è stato possibile raccogliere informazioni specifiche relative alla data dell'ovariectomia. Quasi un 40% della popolazione è costituito da cani di razza meticcica (45 su 113), mentre la restante parte della popolazione è rappresentata dalle seguenti razze: pastore tedesco (10), barboncino (7), yorkshire terrier (6), siberian husky (5), cocker spaniel (4), bassotto (3), golden retriever (3), barbone (2), bassotto tedesco (2), beagle (2), airedale terrier (1), akita inu (1), barbone nano (1), border collie (1), boxer (1), bulldog (1), chin giapponese (1), corso (1), epagneul breton (1), flat coated retriever (1), jack russel terrier (1), maltese (1), pastore australiano (1), pintscher (1), pitbull (1), schnautzer gigante (1), setter inglese (2), shitzu (1). Di 5 animali non è conosciuta la razza.

Il 59,29% dei soggetti aveva masse singole, il 40,71% masse multiple. Il diametro medio della massa maggiore di ciascun soggetto è di 1,48 cm ($1,48 \pm 1,39$ cm), il 41,59% dei soggetti aveva masse di diametro inferiore ad 1 cm, il 27,43% tra 1 e 2 cm, il 14,16% tra 2 e 3 cm, il 12,39% maggiore a 3 cm. Di 5 soggetti (4,42%) non era conosciuto il diametro della massa maggiore.

Ventisei animali (il 23,01%) sono morti durante il periodo post-operatorio in un lasso di tempo intercorso dall'intervento chirurgico che varia tra 1 e 39 mesi. Di questi, 20 sono deceduti per metastasi del tumore mammario o eutanasia condotta a causa del tumore stesso; 6 sono deceduti per cause non correlate al tumore.

Analisi istopatologica

Dei 113 campioni il 26,55% aveva un nodulo singolo benigno, il 3,54% noduli multipli benigni, il 32,74% un nodulo singolo maligno, il 10,62% noduli multipli maligni, il 26,55% noduli multipli benigni e maligni insieme.

Di ciascun caso si è scelto di indagare la lesione benigna di diametro maggiore tra le neoplasie benigne multiple, e la lesione maligna di grading più elevato tra le neoplasie maligne multiple, così che i dati clinici di follow up fossero riferibili alla lesione studiata. Sono stati selezionati gruppi istopatologici specifici e due sottopopolazioni canine quantitativamente raffrontabili di soggetti rispettivamente interi e non interi. Sulla base di questa selezione la popolazione è composta per il 69,91% (79 su 113) da soggetti affetti da neoplasia maligna, ed il 30,09% (34 su 113) da neoplasia benigna. Delle 79 neoplasie maligne, 40 appartengono a soggetti interi, 39 a soggetti non interi; mentre delle 34 neoplasie benigne, 18 sono campioni di soggetti interi e 16 di soggetti non interi. In ordine decrescente di numerosità i tipi istologici selezionati sono: carcinoma complesso (11,5%), adenoma complesso (10,6%), tumore misto benigno (10,6%), carcinoma e tumore misto benigno (10,6%), carcinoma e mioepitelioma semplice (9,7%), adenoma semplice (8,8%), carcinoma comedonico (8,0%), carcinoma tubulo-papillare semplice (8,0%), carcinoma tubulare semplice (6,3%), carcinoma solido semplice (5,3%), carcinoma anaplastico (5,3%), carcinoma intraduttale papillare (5,3%). Delle lesioni maligne, 59,5% sono di grading I, 15,2% di grading II e 25,3% di grading III. La distribuzione in termini di numerosità delle lesioni neoplastiche nella popolazione di 113 soggetti e nelle sottopopolazioni soggetti interi e non interi viene schematizzata in *Tabella 5*.

Il 55,3% delle masse con diametro minore a 1 cm sono risultate di natura benigna, il 74,2% delle lesioni con diametro compreso tra 1 e 2 cm sono risultate di natura maligna, la totalità dei casi con massa di diametro maggiore a 2 cm è risultata di natura maligna.

Il tessuto ghiandolare mammario circostante la lesione neoplastica si è mostrato iperplastico nella maggior parte dei campioni e associato a residui di tessuto duttale/lobulare sano (non iperplastico).

Tabella 5: Classificazione istopatologica dei 113 campioni nelle sottopopolazioni interi e non interi e rispettivo grading delle neoplasie maligne.

Tipo istologico della lesione tumorale	F (N. di campioni)	FC (N. di campioni)	Totale (N. di campioni)
Adenoma complesso	6	6	12
Carcinoma complesso	7	6	13
Adenoma semplice	6	4	10
Carcinoma semplice e mioepitelioma maligno	5	6	11
Carcinoma solido semplice	3	3	6
Carcinoma tubulare semplice	4	3	7
Carcinoma tubulo-papillare semplice	4	5	9
Tumore misto benigno	6	6	12
Carcinoma e tumore misto benigno	6	6	12
Carcinoma anaplastico	3	3	6
Carcinoma comedonico	5	4	9
Carcinoma intraduttale papillare	3	3	6
Totale neoplasie	58	55	113
Benigne	18	16	34
Maligne	40	39	79
Grading I	24	23	47
Grading II	7	5	12
Grading III	9	11	20

F: interi; FC: non interi; N.: numero.

I 26 animali deceduti avevano tutti una neoplasia di tipo maligno, ed escludendo i 6 casi deceduti per causa non correlata, i tipi istologici in ordine decrescente sono i seguenti: carcinoma anaplastico (30%), carcinoma solido semplice (25%), carcinoma comedonico (20%), carcinoma intraduttale papillare (10%), carcinoma complesso (5%), carcinoma semplice con mioepitelioma maligno (5%), carcinoma tubulo-papillare semplice (5%). Al momento della diagnosi, 3 neoplasie avevano grading I, 1 grading II, 16 grading III (80%). Il tempo di sopravvivenza nei soggetti con neoplasia di grading I varia tra 3 e 19 mesi e la media è di 9 mesi ($9 \pm 8,72$); l'unico caso di grading II è sopravvissuto 17 mesi; nei soggetti con neoplasia di grading III gli estremi sono 1 e 20 mesi, la media è di 6,8 mesi ($6,8 \pm 5,17$). Dieci animali erano sessualmente interi e 10 non interi. Del gruppo di animali non interi il 90% aveva neoplasie di grading III, del gruppo di animali interi il 60%.

Analisi immunoistochimica

La colorazione di ER α e PR è stata osservata nella ghiandola mammaria nei nuclei delle cellule epiteliali del tessuto sano/iperplastico e neoplastico e occasionalmente nei nuclei di cellule mioepiteliali neoplastiche dei tumori complessi. Si è osservata una lieve e occasionale positività citoplasmatica dell'epitelio ghiandolare considerata come aspecifica. Occasionalmente si è evidenziata positività anche nei nuclei delle cellule fusate stromali. Inoltre si è osservata una colorazione aspecifica occasionale di elementi leucocitari (macrofagi, mastociti). La valutazione semiquantitativa della positività si è basata solamente sulle cellule di origine epiteliale ed è stata distinta tra tessuto sano/iperplastico e tessuto neoplastico.

In 7 campioni il tessuto ghiandolare sano/iperplastico era assente, e in 4 di questi il tessuto neoplastico è risultato negativo ad entrambi i recettori. In 5 campioni il tessuto ghiandolare sano/iperplastico è risultato negativo ad uno o entrambi gli ormoni, di cui in un campione anche il tessuto ghiandolare neoplastico (mioepitelioma maligno) è risultato negativo. Dettagli sul loro tipo istologico, grading, percentuale di espressione ed intensità di ER α e PR nel tessuto sano e neoplastico sono visualizzati in *Tabella 11*.

Il **tessuto sano/iperplastico** è risultato ER α +/PR+ nel 93,40% dei campioni in cui esso è presente (99 su 106 campioni), in 1 campione è risultato ER α +/PR- (0,94%), in 2 ER α -/PR+ (1,89%), in 4 campioni ER α -/PR- (3,77%).

Dei 113 **tumori** mammari analizzati la maggior parte (88 su 113, cioè il 77,88%) esprime uno o entrambi i recettori, di cui: 73 su 113 (64,60%) sono risultati ER α +/PR+, 25 ER α -/PR- (22,12%), 10 ER α +/PR- (8,85%), 5 ER α -/PR+ (4,42%). Per quanto riguarda le neoplasie **benigne**: 29 su 34 (82,29%) sono risultate ER α +/PR+, 2 ER α +/PR- (5,88%), 1 ER α -/PR+ (2,94%), 1 ER α -/PR- (2,94%). Per quanto riguarda le neoplasie **maligne**: 44 su 79 (55,70%) sono risultate ER α +/PR+, 24 ER α -/PR- (30,38%), 8 ER α +/PR- (10,13%), 4 ER α -/PR+ (5,06%). Pertanto, il 97,06% delle lesioni neoplastiche benigne è risultato positivo ad uno o entrambi i recettori; per le neoplasie maligne il 69,92%. Questi dati sono visualizzati in *Tabella 6*.

Tabella 6: Distribuzione dei campioni secondo lo status recettoriale del tessuto sano e neoplastico.

		ER α +/PR+	ER α +/PR-	ER α -/PR+	ER α -/PR-	Tot N.
		N. campioni (%)	N. campioni (%)	N. campioni (%)	N. campioni (%)	campioni
Campioni totali	Tessuto sano/ip.	99 (93,40%)	1 (0,94%)	2 (1,89%)	4 (3,77%)	106
	Tessuto neopl.	73 (64,60%)	10 (8,85%)	5 (4,42%)	25 (22,12%)	113
Tumori benigni	Tessuto sano/ip.	32 (96,97%)	-	1 (3,03%)	-	33
	Tessuto neopl.	29 (82,29%)	2 (5,88%)	1 (2,94%)	1 (2,94%)	34
Tumori maligni	Tessuto sano/ip.	69 (94,52%)	-	-	4 (5,48%)	73
	Tessuto neopl.	44 (55,70%)	8 (10,13%)	4 (5,06%)	24 (30,38%)	79

ER α : recettore estrogenico α ; PR: recettore progesteronico; n.: numero; neopl.: neoplastico; ip.: iperplastico.

Nel tessuto non neoplastico la percentuale media di cellule positive agli anticorpi per PR ed ER α è risultata rispettivamente di $46,04 \pm 13,55\%$ e $56,89 \pm 14,49\%$ con valori estremi di 1,3% e 77,6% per PR e 21,3% e 87,8% per ER α ; non vi è differenza di espressione recettoriale media tra tessuto sano/iperplastico circostante una neoplasia maligna o benigna. Da questo calcolo sono stati esclusi i campioni con tessuto sano/iperplastico negativo in quanto considerabile potenzialmente dovuto ad artefatti di tipo tecnico (Snead *et al.*, 1993; Nieto *et al.*, 2000). Nel tessuto neoplastico benigno le percentuali medie dell'espressione di PR e ER α sono risultate rispettivamente pari a $35,26 \pm 21,40\%$ e $35,42 \pm 22,19\%$, mentre per i tumori maligni si sono evidenziate medie pari a $12,58 \pm 19,26\%$ e $11,59 \pm 18,48\%$. I campioni con tessuto neoplastico negativo e tessuto sano/iperplastico positivo sono stati inclusi nel calcolo. Per quanto riguarda le sottopopolazioni di cagne intere e non intere, queste ultime presentano valori medi di espressione recettoriale inferiori rispetto le cagne intere, ad eccezione del valore medio di espressione di ER α nei tumori benigni: le percentuali medie di espressione di PR e ER α nelle cagne non intere sono rispettivamente pari a $31,66 \pm 22,47\%$ e $35,85 \pm 21,45\%$ nei tumori benigni; $8,23 \pm 14,34\%$ e $7,52 \pm 12,73\%$ nei tumori maligni. I risultati sinora descritti vengono illustrati in **Tabella 7**.

Tabella 7: Percentuale media e intensità di espressione di ER α e PR nel tessuto sano/iperplastico e neoplastico e nelle sottopopolazioni di soggetti interi e non interi.

media	Tessuto sano/iperp.		Tessuto neoplastico			
	% PR \pm ds	% ER α \pm ds	% PR \pm ds	% ER α \pm ds	Intensità PR \pm ds	Intensità ER α \pm ds
totale	46,04 \pm 13,55	56,89 \pm 14,49	19,40 \pm 22,41	18,76 \pm 22,44	1,73 \pm 1,32	1,86 \pm 1,35
F	43,73 \pm 13,00	59,06 \pm 17,30	23,53 \pm 23,90	21,61 \pm 24,15	1,95 \pm 1,30	2 \pm 1,28
FC	48,60 \pm 13,81	54,55 \pm 10,34	15,05 \pm 20,03	15,77 \pm 20,26	1,49 \pm 1,32	1,71 \pm 1,41
benigni	47,35 \pm 10,62	54,54 \pm 10,78	35,26 \pm 21,40	35,42 \pm 22,19	2,41 \pm 0,99	2,59 \pm 1,10
F	47,17 \pm 8,67	54,44 \pm 14,12	38,46 \pm 20,50	35,03 \pm 23,44	2,39 \pm 0,98	2,39 \pm 0,98
FC	47,53 \pm 12,66	54,63 \pm 6,35	31,66 \pm 22,47	35,86 \pm 21,45	2,44 \pm 1,03	2,81 \pm 1,22
maligni	45,43 \pm 14,76	57,97 \pm 15,86	12,58 \pm 19,26	11,59 \pm 18,48	1,43 \pm 1,35	1,54 \pm 1,33
F	42,15 \pm 14,40	61,06 \pm 18,32	16,82 \pm 22,42	15,56 \pm 22,18	1,75 \pm 1,40	1,83 \pm 1,36
FC	49,19 \pm 14,49	54,51 \pm 11,90	8,23 \pm 14,34	7,52 \pm 12,73	1,1 \pm 1,23	1,26 \pm 1,23

ER α : recettore estrogenico α ; PR: recettore progesteronico; F: interi; FC: non interi; ds.: deviazione standard. Intensità: 0 = assente, 1 = lievissima, 2 = lieve, 3 = moderata, 4 = moderata-intensa, 5 = intensa.

Nel tessuto neoplastico sono stati rilevati 5 gradi di intensità a cui è stato attribuito un numero da 1 a 5: assente (0), lievissima (1), lieve (2), moderata (3), moderata-intensa (4), intensa (5). Il grado 5 è stato assegnato qualora l'intensità fosse pari a quella del tessuto sano. All'interno del tessuto sano/iperplastico l'intensità variava da lobulo a lobulo, mentre le cellule di uno stesso lobulo presentavano uguale intensità di colorazione. Nella maggior parte delle lesioni neoplastiche l'intensità è molto eterogenea: si riscontrano frequentemente aree o singole cellule intensamente positive vicino ad aree con segnale molto debole o assente. Nel tessuto neoplastico maligno il segnale è prevalentemente assente (40,5% per PR e 35,4% per ER α), seguito da valori di intensità 3, 2, 1 e 4. Nelle neoplasie benigne il grado d'intensità maggiormente rappresentato è il valore 3 (58,8% per PR e 47,1% per ER α), seguito dal grado 2, 0, 1 e 4 (questi ultimi tre gradi per ER α hanno identica frequenza del 5,9%). La loro distribuzione viene

schematizzata in *Tabella 8*. Come per l'espressione recettoriale percentuale, anche per l'intensità della colorazione si è riscontrata una media più bassa nella sottopopolazione degli animali non interi rispetto quelli interi, sia all'interno della popolazione totale che nel gruppo affetto da neoplasia maligna, ma non nel gruppo affetto da neoplasia benigna (si veda *Tabella 7*).

Tabella 8: Distribuzione dell'intensità del segnale di espressione di PR ed ERα nel tessuto neoplastico benigno e maligno.

Intensità	Neoplasie benigne (tot. 34)		Neoplasie maligne (tot. 79)	
	PR N. di campioni (percentuale)	ERα N. di campioni (percentuale)	PR N. di campioni (percentuale)	ERα N. di campioni (percentuale)
5	-	2 (5,88%)	-	-
4	1 (2,94%)	2 (5,88%)	2 (2,53%)	3 (3,80%)
3	20 (58,82%)	16 (47,06%)	23 (29,11%)	22 (27,85%)
2	8 (23,53%)	10 (29,41%)	14 (17,72%)	18 (22,78%)
1	2 (5,88%)	2 (5,88%)	8 (10,13%)	8 (10,13%)
0	3 (8,82%)	2 (5,88%)	32 (40,51%)	28 (35,44%)

ERα: recettore estrogenico α; PR: recettore progesteronico.

Intensità: 0 = assente, 1 = lievissima, 2 = lieve, 3 = moderata, 4 = moderata-intensa, 5 = intensa.

Le lesioni neoplastiche di animali di età superiore a 10 anni hanno mostrato medie di percentuale ed intensità d'espressione inferiori ($13,43 \pm 21,57\%$ e intensità $1,20 \pm 1,34$ per PR; $11,76 \pm 20,28\%$ e intensità $1,35 \pm 1,41$ per ERα) alle lesioni di animali più giovani di 10 anni ($24,81 \pm 22,56\%$ e intensità $2,14 \pm 1,16$ per PR; $25,02 \pm 23,00\%$ e intensità $2,22 \pm 1,17$ per ERα), così come le lesioni neoplastiche appartenenti a noduli di dimensioni superiori a 2 cm di diametro ($5,38 \pm 22,42\%$ e intensità $0,67 \pm 1,3$ per PR; $6,83 \pm 22,46\%$ e intensità $1,20 \pm 1,33$ per ERα) rispetto a quelle dei noduli di diametro inferiore a 2 cm ($25,73 \pm 22,50\%$ e intensità $2,18 \pm 1,15$ per PR; $24,38 \pm 22,54\%$ e intensità $2,19 \pm 1,18$ per ERα).

I tipi istologici risultati con la media di positività recettoriale più bassa per entrambi i recettori sono il carcinoma solido semplice ($0,40 \pm 0,63\%$ per PR, $2,55 \pm 5,63\%$ per ERα), il carcinoma anaplastico ($1,32 \pm 2,93\%$ per PR e $1,53 \pm 2,80\%$ per ERα) ed il carcinoma comedonico ($1,34 \pm 2,72\%$ per PR, $1,27 \pm 3,8\%$ per ERα). I tipi istologici con la media più alta, invece, sono le neoplasie benigne ed il carcinoma tubulare semplice ($44,11 \pm 22,19\%$ per PR e $37,63 \pm 32,12\%$ per

ER α). Nelle neoplasie benigne non vi è una netta differenza nell'espressione recettoriale media tra il gruppo di cani interi e non interi; al contrario, in tutte le categorie istologiche maligne i cani non interi hanno mostrato una media di positività nettamente inferiore a quella dei cani interi, ad eccezione dei cani affetti da carcinoma complesso e carcinoma anaplastico in cui si è evidenziata una condizione contraria. Si veda per i dettagli la seguente **Tabella 9**.

Tabella 9: Media di espressione recettoriale di PR ed ER α nelle diverse tipologie tumorali.

Tipo istologico	F+FC		F		FC	
	% PR ± ds	% ER α ± ds	% PR ± ds	% ER α ± ds	% PR ± ds	% ER α ± ds
Adenoma complesso	37,78 ±19,61	39,28 ±18,71	39,62 ±20,86	39,63 ±22,27	35,95 ±20,06	38,93 ±16,56
Carcinoma complesso	17,41 ±19,85	13,09 ±15,74	12,14 ±15,32	10,17 ±12,47	23,55 ±24,08	16,50 ±19,54
Adenoma semplice	39,33 ±21,67	39,20 ±23,72	45,80 ±14,93	37,37 ±23,83	29,63 ±28,79	41,95 ±26,91
Carcinoma e mioepitelioma maligno	3,30 ±7,93	4,75 ±9,10	5,20 ±11,63	6,56 ±12,65	1,72 ±3,32	3,23 ±5,61
Carcinoma solido semplice	0,40 ±0,63	2,55 ±5,63	0,47 ±0,81	4,67 ±8,08	0,33 ±0,58	0,43 ±0,75
Carcinoma tubulare semplice	44,11 ±22,19	37,63 ±32,12	57,18 ±14,10	47,73 ±35,68	26,70 ±19,58	24,17 ±26,65
Carcinoma tubulo-papillare semplice	13,74 ±26,31	13,28 ±26,93	23,23 ±38,92	22,85 ±40,26	6,16 ±9,30	5,62 ±8,37
Tumore misto benigno	29,34 ±23,33	28,42 ±24,17	29,95 ±24,86	28,10 ±26,73	28,73 ±24,06	28,73 ±23,88
Carcinoma con tumore misto benigno	13,88 ±13,60	14,56 ±12,92	21,18 ±14,44	20,68 ±14,86	6,57 ±8,39	8,43 ±7,44
Carcinoma anaplastico	1,32 ±2,93	1,53 ±2,80	0,10 ±0,17	0,70 ±1,21	2,53 ±4,13	2,37 ±4,01
Carcinoma comedonico	1,34 ±2,72	1,27 ±3,8	2,42 ±3,36	2,28 ±5,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
Carcinoma intraduttale papillare	18,30 ±18,52	16,67 ±14,52	33,07 ±12,88	28,20 ±7,00	3,53 ±6,12	5,13 ±8,89

ER α : recettore estrogenico α ; PR: recettore progesteronico; F: interi; FC: non interi; ds: deviazione standard.

Considerando il grading istologico delle neoplasie maligne, si riscontrano valori medi di espressione ed intensità recettoriale diversi nelle tre diverse categorie. I valori medi della percentuale di espressione recettoriale nelle neoplasie di grado

III è minore rispetto a quelli delle neoplasie di grado I e II (5,10% e 5,96% rispettivamente per PR e ER α per il grading III, 14-15% per PR ed ER α delle neoplasie di grading I e II). Se si considera lo stato riproduttivo degli animali, all'interno della sottopopolazione non interi i valori medi di percentuale d'espressione recettoriale nelle neoplasie di grado II sono minori rispetto le neoplasie di grado I, e diminuiscono ulteriormente nelle neoplasie di grado III. All'interno della sottopopolazione di animali interi, la media d'espressione nelle neoplasie di grado II è maggiore rispetto quella di grado I, in particolar modo quella di ER α (18,79 \pm 29,58% e 18,66 \pm 18,88% rispettivamente per PR; 19,43 \pm 34,17% e 15,66 \pm 16,29% rispettivamente per ER α). Per quanto riguarda l'intensità d'espressione, si riscontra una diminuzione progressiva all'aumentare del grado di malignità in entrambe le sottopopolazioni di animali interi e non interi. I valori sono illustrati nella seguente **Tabella 10**.

Tabella 10: Percentuale media e intensità di espressione di ER α e PR nelle neoplasie maligne di diverso grading istologico e nelle sottopopolazioni di soggetti interi e non interi.

Grading	Popolazione	% PR \pm ds	% ERα \pm ds	Intensità PR \pm ds	Intensità ERα \pm ds
Grading I	Tot Maligni	15,31 \pm18,26	13,26 \pm15,82	1,81 \pm1,31	1,87 \pm1,19
	F	18,66 \pm 18,88	15,66 \pm 16,29	2,13 \pm 1,26	2,13 \pm 1,15
	FC	11,83 \pm 17,27	10,76 \pm 15,28	1,48 \pm 1,31	1,61 \pm 1,20
Grading II	Tot Maligni	14,33 \pm23,24	14,47 \pm26,38	1,5 \pm1,51	1,33 \pm1,44
	F	18,79 \pm 29,58	19,43 \pm 34,17	1,71 \pm 1,70	1,43 \pm 1,62
	FC	8,1 \pm 9,46	7,52 \pm 7,71	1,2 \pm 1,30	1,2 \pm 1,30
Grading III	Tot Maligni	5,10 \pm18,02	5,96 \pm18,63	0,5 \pm0,83	0,9 \pm1,37
	F	10,38 \pm 26,62	12,3 \pm 27,14	0,78 \pm 1,09	1,33 \pm 1,66
	FC	0,78 \pm 2,18	0,76 \pm 2,10	0,27 \pm 0,47	0,55 \pm 1,04

ER α : recettore estrogenico α ; PR: recettore progestinico; F: interi; FC: non interi; ds: deviazione standard.

Nel gruppo dei 20 animali deceduti per cause correlate al tumore mammario la media di percentuale d'espressione dei recettori PR ed ER α è risultata pari a

6,68 ± 20,00% e 7,15 ± 19,73% rispettivamente. Essa è inferiore sia alla media dell'intera popolazione affetta da neoplasia maligna (12,58% per PR e 11,59% per ERα), sia alla media della popolazione dei cani affetti da neoplasia maligna risultati in vita nel periodo di follow up (14,97% per PR e 13,36% per ERα). La media di espressione dei 10 cani non interi deceduti è inoltre molto inferiore a quella dei 10 cani interi deceduti: 0,86 ± 2,28% per PR e 0,84 ± 2,20% per ERα nei cani non interi contro 12,50 ± 27,64% e 13,46 ± 26,99%, rispettivamente, nei cani interi. Anche l'intensità media di espressione è inferiore negli animali non interi deceduti: 0,3 ± 0,48 contro 0,9 ± 1,29 per PR, 0,6 ± 1,07 contro 1,2 ± 1,62 per ERα.

Tabella 11: Medie percentuali ed intensità di espressione di PR ed ERα nel tessuto sano e neoplastico dei campioni con negatività ad uno dei due anticorpi o entrambi nel tessuto sano.

Tipo istologico	Grading	% PR tessuto sano	% PR tessuto neopl.	Intensità PR tessuto neopl.	% ERα tessuto sano	% ERα tessuto neopl.	Intensità ERα tessuto neopl.
C. e mioepitelioma maligno	1	0	0	0	0	0	0
C. complesso	2	0	7	1	0	6,8	2
Tumore misto benigno	-	41	5,3	3	0	6,8	3
A. complesso	-	nd	0	0	nd	0	0
C. complesso	1	0	34,8	3	0	33,6	3
C. comedonico	3	nd	0	0	nd	0	0
C. e tumore misto benigno	1	nd	15,8	3	87,8	16,5	2
C. anaplastico	3	nd	0,3	1	nd	0,1	1
C. comedonico	3	50	5	2	nd	11,4	3
C. intraduttale papillare	2	0	10,6	3	0	15,4	3
C. solido semplice	3	nd	0	0	nd	0	0
C. comedonico	3	nd	0	0	nd	0	0

ERα: recettore estrogenico α; PR: recettore progestinico; F: interi; FC: non interi; nd: non conosciuto; Neopl.: neoplastico; C.: carcinoma; A.: adenoma.

Valutazione statistica dei risultati

Sono stati esclusi dalle analisi statistiche i 12 campioni con tessuto sano/iperplastico assente o negativo, non potendo escludere la potenziale presenza di artefatti di tipo tecnico. Sono inoltre stati esclusi due campioni con adenoma complesso di cui non si disponeva la completezza dei dati valutati nell'analisi statistica.

Sono stati valutati singolarmente gli effetti sulla percentuale di espressione recettoriale di ER α e PR di fattori quali la tipologia della lesione neoplastica (benigna o maligna), la distribuzione della lesione (noduli multipli o singoli), il sottotipo tumorale (tumore complesso o semplice), ed i 12 tipi istologici selezionati, controllando per tipo di tessuto (sano/iperplastico e neoplastico) e lo stato riproduttivo dell'animale (intero e non intero). Le differenze delle medie di espressione di entrambi i recettori tra tessuto sano/iperplastico e neoplastico, tra lesione benigna e maligna, e tra i diversi tipi istologici sono risultate statisticamente significative (rispettivamente $p < 0,0001$ per ER α e PR; $p = 0,0004$ per ER α , $p < 0,0001$ per PR; $p = 0,004$ per ER α , $p < 0,0001$ per PR). L'effetto della sterilizzazione è risultato statisticamente significativo nell'influenzare la differenza di media di espressione di entrambi i recettori ormonali tra noduli singoli e noduli multipli ($p = 0,04$ per ER α , $p = 0,003$ per PR), tumore complesso e tumore semplice ($p = 0,04$ per ER α , marginalmente $p = 0,07$ per PR); per PR è risultato statisticamente significativo anche nell'influenzare la differenza di media di espressione tra tessuto sano/iperplastico e neoplastico ($p = 0,006$).

Sono stati valutati gli effetti dei medesimi fattori sulla media di intensità di espressione recettoriale di ER α e PR nel tessuto neoplastico. Per entrambi i recettori, la differenza delle medie d'intensità della lesione neoplastica tra lesione benigna e lesione maligna e quella tra i diversi tipi istologici sono risultate statisticamente significative (rispettivamente $p < 0,0001$ per ER α , $p = 0,0002$ per PR; $p < 0,0001$ per ER α e PR). La differenza delle medie di intensità di espressione di ER α tra neoplasia benigna e maligna è significativamente diversa tra soggetti interi e non interi ($p = 0,05$).

La variabilità individuale di ciascun soggetto non ha avuto un effetto statisticamente significativo.

Considerando insieme gli effetti della tipologia della lesione, della distribuzione

delle lesioni, del sottotipo tumorale, della sterilizzazione, dell'età, del diametro maggiore della neoplasia, della presenza/assenza di cellule neoplastiche nei margini di escissione, della presenza/assenza di invasione linfatica, e del valore dell'indice mitotico sulla media della percentuale di espressione di ER α e PR nel tumore, sono risultati statisticamente significativi gli effetti della tipologia della neoplasia e la sterilizzazione per ER α e PR (rispettivamente $p=0,005$ per ER α , $p=0,05$ per PR; $p=0,06$ per ER α , $p=0,004$ per PR), il diametro per PR ($p=0,04$). L'effetto del diametro della neoplasia risulta statisticamente significativo per la media di espressione di ER α se si esclude dall'analisi la tipologia della lesione. Analizzando solamente le lesioni maligne ed includendo come fattore il grading istologico, il suo effetto non risulta statisticamente significativo. L'effetto del grading risulta statisticamente significativo se si escludono dalla valutazione il diametro della neoplasia e l'indice mitotico.

Considerando insieme gli effetti sulla media di intensità di espressione di ER α e PR dei medesimi fattori sovraccitati, risulta marginalmente significativo l'effetto della tipologia della lesione per ER α ($p=0,07$), statisticamente significativi gli effetti della sterilizzazione ($p=0,02$), del diametro ($p=0,008$) e dell'indice mitotico ($p=0,003$) per PR. Analizzando solamente le lesioni maligne ed includendo nella valutazione il grading, risulta marginalmente significativo l'effetto della sterilizzazione per ER α ($p=0,06$), statisticamente significativo l'effetto della sterilizzazione ($p=0,003$), del diametro ($p=0,004$), e dell'indice mitotico ($p=0,005$) per PR.

Nell'analisi dei dati di follow up è stato valutato l'effetto della percentuale media di espressione recettoriale di ER α e PR, della sterilizzazione, del diametro, dei margini di escissione, dell'invasione vascolare, e dell'indice mitotico sul tempo di sopravvivenza. L'effetto risultato statisticamente significativo è quello dell'invasione linfatica e marginalmente quello dell'indice mitotico (rispettivamente $p=0,006$, $p=0,07$).

DISCUSSIONE

I 113 campioni oggetto di questo studio sono stati selezionati dal database del Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova, sulla base della diagnosi istologica e stato riproduttivo dell'animale. Si è voluto indagare i tipi istologici più frequenti nella specie canina (adenoma semplice, adenoma complesso, tumore misto benigno, carcinoma complesso, carcinoma e tumore misto benigno, carcinoma tubulare semplice, carcinoma tubulo-papillare semplice, carcinoma solido semplice, carcinoma anaplastico) ed alcuni nuovi sottotipi tumorali recentemente descritti (carcinoma comedonico, carcinoma intraduttale papillare, carcinoma e mioepitelioma maligno) in due sottopopolazioni canine quantitativamente raffrontabili di soggetti rispettivamente interi e non interi per ciascun tipo istologico (Goldschmidt *et al.*, 2011). I campioni provengono da cliniche e laboratori distribuiti su tutto il territorio italiano, pertanto, seppur limitatamente, i loro dati forniscono un quadro epidemiologico della popolazione canina italiana.

L'età media in cui è stata diagnosticata la neoplasia mammaria dei campioni di questo studio è di 9,4 anni. Ciò conferma l'osservazione degli studi precedenti che il tumore mammario canino è tipicamente una malattia del cane adulto-anziano (Taylor *et al.*, 1976; Pérez-Alenza *et al.*, 2000; Sorenmo *et al.*, 2009).

La razza maggiormente rappresentata in questo studio è la razza meticcia, costituita dal 39,8% della popolazione di 113 cani, seguita dalla razza pastore tedesco (8,8%), barboncino (6,2%), yorkshire terrier (5,3%) e siberian husky (4,4%). Tale distribuzione percentuale delle razze, più che indicativa di un reale aumento di rischio di sviluppo di neoplasia mammaria, sembra riflettere la composizione della popolazione canina in Italia, in cui i meticci sono la razza più diffusa, seguiti dai cani da ferma (in questo studio non rappresentati), cani pastori e terrier (ENCI, 2010; FCI, 2010). La valutazione di un'eventuale predisposizione di razza richiederebbe una più accurata e dettagliata indagine epidemiologica.

Nella valutazione del segnale di espressione di ER α e PR in questo studio non si è stabilito alcun valore di *cut-off* negativo, ma i valori di espressione percentuale sono stati utilizzati come tali. Alcuni autori hanno utilizzato per il tumore mammario canino e felino un *cut-off* negativo pari al 5% (Martin *et al.*, 2002, 2005; Millanta *et al.*, 2005). In medicina umana si considerano negativi quei

tumori in cui la somma dei punteggi attribuiti alla percentuale di espressione recettoriale e all'intensità media stimate è minore a 3, ed il valore 0 corrisponde ai tumori con numero di cellule positive inferiore al 5% (Allred *et al.*, 1998; Mohsin *et al.*, 2004). Tali studi sono stati validati sulla base di analisi del tempo di sopravvivenza condotte su 1900 pazienti affetti da tumore al seno nella valutazione dell'espressione di ER α , 1400 pazienti nella valutazione dell'espressione di PR; pertanto, in medicina veterinaria, sarebbero necessari studi immunohistochimici associati ad analisi di follow up di un alto numero di casi per poter validare un reale valore di *cut-off* negativo o un sistema di *scoring* di valore realmente prognostico.

In accordo con quanto riportato in letteratura tra il 94,52% e il 100% del tessuto sano è risultato positivo ad uno o entrambi i recettori (Rutteman *et al.*, 1988; Donnay *et al.*, 1995; Millanta *et al.*, 2005). Nonostante il maggior numero di lesioni maligne rispetto a quelle benigne, la maggior parte delle lesioni neoplastiche è risultata positiva ad uno (il 77,88%) o entrambi i recettori (64,40%), con percentuali di cellule positive all'interno delle lesioni raffrontabili a quelle del tumore al seno (65-70%) (MacEwen *et al.*, 1982; Van Zwieten, 1984; Martin *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005). Il numero di tumori risultati ER α /PR- è stato minore rispetto ai risultati di altri studi (Martin *et al.*, 2005; Illera *et al.*, 2006). Ciò può essere dovuto ai diversi sistemi di *scoring* della positività o alla valutazione di gruppi tumorali diversi (ad es. vi è prevalenza in alcuni studi di tipi istologici che mediamente esprimono una positività bassa o nulla: il carcinoma tubulo-papillare semplice, carcinoma solido, carcinoma anaplastico) (Nieto *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005). Al contrario di quanto riscontrato in altri studi in cui il fenotipo PR+ prevale sul fenotipo ER α + sia nelle neoplasie benigne sia nelle neoplasie maligne, e in quest'ultime il fenotipo ER α -/PR+ prevale su quello ER α + /PR+, in questo studio sia nelle neoplasie benigne sia nelle neoplasie maligne il fenotipo più rappresentato è stato quello ER α + /PR+ (82,29% e 55,70% rispettivamente), ed il fenotipo ER α + /PR- è prevalso su quello ER α - /PR+ in accordo con lo studio di Millanta e collaboratori (2005) (Martin *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2009). Tali discrepanze fenotipiche, oltre che a differenze biologiche intertumoralmente diversamente rappresentate a seconda dei gruppi di campioni, potrebbero essere dovute anche ad artefatti di tipo tecnico (preservazione dei campioni, metodiche e protocolli immunohistochimici differenti)

o soggettivi (valutazione della positività da parte dell'operatore). Queste considerazioni mettono in luce quanto sia importante, in studi di questo genere, una standardizzazione della procedura immunohistochimica che permetta di ottenere risultati confrontabili tra diversi laboratori e diversi studi. Solo in cinque campioni, anche in questo studio si sono riscontrati tumori ER α -/PR+. La presenza del recettore PR in assenza di quello per gli estrogeni potrebbe indicare che nel tessuto neoplastico canino, come ipotizzato per quello felino, possa rendersi non necessaria l'integrità del *pathway* degli estrogeni, diversamente da quanto avverrebbe in condizioni fisiologiche (Hulka *et al.* 1994; Martin *et al.*, 2002, 2005; Millanta *et al.*, 2005). Si sottolinea che in questo lavoro si è evidenziata come seconda categoria prevalente il fenotipo ER α + /PR- nel tumore mammario benigno e il fenotipo ER α - /PR- nel tumore maligno, suggerendo un'associazione tra progressione della malignità e perdita dell'ormono-dipendenza (Fisher *et al.*, 1987; Gerdes *et al.*, 1987; Rutteman *et al.*, 1988; Geraldès *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda la percentuale di espressione recettoriale, le percentuali medie sia di ER α sia di PR sono risultate più elevate nel tessuto sano/ipertrofico (ER α 56,89%; PR 46,8%) rispetto al tessuto neoplastico benigno (ER α 35,42%; PR 35,26%) e maligno (ER α 11,59%; PR 12,58%) (Rutteman *et al.*, 1988; Nieto *et al.*, 2000; Millanta *et al.*, 2005; Thuroczy *et al.*, 2007). Anche l'intensità di espressione recettoriale si è evidenziata inferiore nelle neoplasie maligne rispetto alle neoplasie benigne. Tale differenza di espressione recettoriale tra tessuto sano/ipertrofico e neoplastico in ciascun campione si è rivelata statisticamente significativa ($p < 0,0001$ per ER α e PR), così come la differenza di percentuale e di intensità di espressione recettoriale tra tessuto benigno e maligno ($p = 0,0004$ per %ER α , $p < 0,0001$ per %PR; $p < 0,0001$ per l'intensità di ER α , $p = 0,0002$ per l'intensità di PR).

In questo studio si sono evidenziate marcate differenze di espressione recettoriale anche tra i 12 tipi istologici analizzati. Le neoplasie di tipo complesso hanno presentato mediamente un maggior numero di cellule positive (21,56%) rispetto alle neoplasie di tipo semplice (16,45%). I tipi istologici con media di percentuale d'espressione più elevata sono stati in ordine decrescente: l'adenoma complesso (39,28%), l'adenoma semplice (39,20%) ed il carcinoma tubulare semplice (37,63%) per ER α ; il carcinoma tubulare semplice (44,11%),

adenoma semplice (39,33%) e l'adenoma complesso (37,38%) per PR. I tipi istologici con la media di positività percentuale più bassa sono in ordine crescente: il carcinoma comedonico (1,27%), carcinoma anaplastico (1,53%), carcinoma solido semplice (2,55%) e carcinoma e mioepitelioma maligno (4,75%) per ER α ; il carcinoma solido semplice (0,40%), carcinoma anaplastico (1,32%), carcinoma comedonico (1,34%) e carcinoma e mioepitelioma maligno (3,30%) per PR. Gli altri tipi istologici hanno presentato medie di espressione di valori intermedi tra 13-19%. Il grado medio dell'intensità segue l'andamento della percentuale d'espressione, con valori più elevati nei tumori benigni ed il carcinoma tubulare semplice (grado d'intensità > 2), e valori più bassi nel carcinoma anaplastico, solido semplice, comedonico e carcinoma e mioepitelioma maligno (grado d'intensità < 1,27). Si sottolinea che queste ultime due tipologie istopatologiche rappresentano forme di nuovo inserimento nella classificazione e pertanto mai incluse negli altri lavori (Goldschmidt *et al.*, 2011). Inoltre, contenendo questi un numero inferiore di tipi istologici e di numerosità variabile, i risultati non sono facilmente confrontabili. Tuttavia, in letteratura, il carcinoma solido e l'anaplastico appaiono tra i tipi istologici con più bassa percentuale media di espressione recettoriale e in uno studio di Martin e collaboratori (2005) si è riscontrata una relazione di tipo statistico tra la presenza di uno o entrambi i recettori ormonali ed il tipo istologico (Nieto *et al.*, 2000; Millanta *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005). Sebbene nel presente studio la numerosità per ciascuna classe istologica non fosse elevata, la differenza tra le medie di percentuale e d'intensità d'espressione sia di ER α sia di PR si è dimostrata statisticamente significativa, indipendentemente dall'effetto della sterilizzazione (rispettivamente $p=0,004$ per %ER α , $p<0,0001$ per %PR; $p<0,0001$ per l'intensità di ER α e PR). È interessante notare che i dati riportati in letteratura indicano un valore protettivo della componente mioepiteliale dei tumori complessi con comportamento pertanto meno aggressivo dei tumori di tipo semplice (Misdorp, 1999; Rasotto, 2011). Similmente è stata riconosciuta una valenza prognostica per i sottotipi istopatologici del tumore mammario canino (Misdorp, 1999; Rasotto, 2011). Tali considerazioni lasciano intendere che una perdita dell'espressione recettoriale sia associata a neoplasie che presentano presumibilmente un comportamento più aggressivo.

Dall'esame istopatologico delle lesioni è risultato che l'87% delle lesioni di

dimensioni maggiori ad 1 cm ed il 100% delle lesioni di dimensioni al di sopra di 2 cm in questo studio erano di natura maligna. Le lesioni tumorali mammarie maligne generalmente hanno un indice mitotico più elevato ed esprimono un maggior numero di marcatori di proliferazione rispetto alle lesioni displastiche e neoplastiche benigne, riflettendo una maggior rapidità di crescita delle lesioni maligne (Preziosi *et al.*, 1995; Pena *et al.*, 1998). Rispetto all'espressione recettoriale di ER α e PR, noduli di dimensioni ridotte hanno presentato un maggior numero di cellule ER α + e/o PR+ rispetto i noduli più grandi, similmente a quanto evidenziato da altri autori (l'85% dei noduli di diametro inferiore a 2 cm; il 40% dei noduli di dimensioni maggiori) (Martin *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2009). I primi presentano inoltre medie di percentuale ed intensità di espressione superiori (24,38% e 25,73%, intensità 2,19 e 2,18 rispettivamente per ER α e PR) rispetto ai noduli di dimensione maggiore a 2 cm (6,83% e 5,38%, intensità 1,20 e 0,67 rispettivamente per ER α e PR). Valutando in analisi statistica insieme gli effetti della tipologia della lesione (benigna/maligna), della sterilizzazione, dell'età, della distribuzione delle lesioni (singole/multiple), del sottotipo tumorale (semplice/complesso), del diametro, dei margini, dell'invasione linfatica e dell'indice mitotico, sulla media di percentuale ed intensità di espressione di ciascun recettore ormonale, l'aumento del diametro tumorale è risultato statisticamente associato alla riduzione delle medie di percentuale ed intensità di espressione di PR ($p=0,006$ per %PR, $p=0,008$ per intensità di PR), ma non di ER α . In aggiunta anche in questa analisi si è confermato che la diminuzione delle percentuali di espressione è associata alla malignità della lesione ($p=0,005$ per ER α e $p=0,05$ per PR). La riduzione dell'espressione recettoriale di entrambi i recettori, in particolare di PR, in tumori di dimensioni più elevate suggerisce che possano essere utilizzati pathway proliferativi alternativi alla stimolazione degli ormoni sessuali, come ad esempio altri ormoni (ad esempio l'ormone della crescita o la prolattina) o fattori di crescita locali (Van Garderen & Schalken, 2002; Queiroga *et al.*, 2005, 2009). In aggiunta, per quanto riguarda la riduzione dell'espressione di PR, è da sottolinearsi che l'acquisizione di una maggior capacità proliferativa potrebbe essere conseguente alla mancanza del controllo inibitore esercitato dal progesterone ed alcuni suoi metaboliti (Musgrove *et al.*, 1991; Hulka *et al.*, 1994; Sutherland *et al.*, 1998; Wiebe, 2006).

Per quanto riguarda l'età dell'animale, in uno studio immunoistochimico su ER α è

stata riscontrata una correlazione negativa significativa tra età ed espressione recettoriale ormonale (Nieto *et al.*, 2000). Nel presente studio si è osservata una diminuzione delle medie di percentuale ed intensità d'espressione sia di ER α sia di PR negli animali più anziani di 10 anni (11,76% e 13,43% rispettivamente, intensità 1,35 e 1,34) rispetto quelli più giovani (25,02% e 24,81% rispettivamente, intensità 1,41 e 1,20), ma all'interno dell'analisi multifattoriale sovraccitata non è emerso un effetto dell'età statisticamente significativo. L'apparente diminuzione del segnale di espressione recettoriale potrebbe essere attribuibile al diametro anziché all'età, avendo gli animali anziani di questa popolazione un diametro medio maggiore ($1,82 \pm 1,62$ cm) rispetto gli animali più giovani ($1,11 \pm 0,80$ cm), ed essendo l'effetto del diametro statisticamente significativo.

Le numerosità raffrontabili di animali interi e non interi presenti in questo studio hanno permesso di far emergere, delle differenze statisticamente significative nell'espressione dei recettori ormonali nelle due sottopopolazioni canine (Nieto *et al.* 2000). Nella valutazione dell'effetto di diversi fattori quali la tipologia della lesione (benigna/maligna), la sterilizzazione, l'età, la distribuzione delle lesioni (singole/multiple), il sottotipo tumorale (semplice/complesso), il diametro, i margini di escissione, l'invasione linfatica e l'indice mitotico, si conferma l'associazione tra avvenuta sterilizzazione e riduzione delle percentuali di espressione di entrambi i recettori ($p=0,06$ per ER α e $p=0,04$ per PR) e riduzione dell'intensità di PR ($p=0,02$). Nelle lesioni maligne il suo effetto è risultato statisticamente significativo sia sulla percentuale sia sull'intensità di espressione di entrambi i recettori ($p=0,01$ per ER α , $p=0,006$ per PR; $0,06$ per l'intensità di ER e $p=0,003$ per PR), superando l'effetto del grading. Secondo i risultati dell'analisi statistica il fattore sterilizzazione determina una differenza maggiore nella percentuale di espressione recettoriale tra noduli singoli e multipli ($p=0,04$ per ER α , $p=0,003$ per PR), tumori semplici e complessi ($p=0,04$ per ER α , $p=0,07$ per PR), solo di quella di PR tra tessuto sano/ipерplastico e tessuto neoplastico ($p=0,006$); e nell'intensità di espressione recettoriale di ER α tra neoplasie benigne e maligne ($p=0,05$). L'assenza delle gonadi femminili e per cui degli ormoni ovarici, che fisiologicamente stimolano l'espressione dei propri recettori, spiega comprensibilmente la minor positività recettoriale in termini di percentuale e di intensità di espressione nel tessuto neoplastico degli animali non interi

rispetto quelli a interi (Hulka *et al.*, 1994). Tuttavia in questo lavoro alcuni sottotipi istologici tumorali hanno mostrato un'inversione di questa tendenza (carcinoma complesso e anaplastico di animali non interi mostrano medie più elevate di ER α e PR, adenoma semplice e tumore misto benigno di animali non interi mostrano valori medi più elevati di ER α) suggerendo la necessità di indagare e comprendere il processo cancerogenetico non nel carcinoma mammario generalmente inteso ma considerando le diverse sottotipologie istopatologiche. In aggiunta apparentemente i dati di questo studio hanno mostrato valori di espressione nel tessuto sano/ipertrofico di soggetti non interi non significativamente differenti da quelli interi, aspetto che rimane da essere chiarito. A causa della scarsità delle informazioni sulla data dell'ovariectomia, infatti, non è possibile fare considerazioni dettagliate. Si può ipotizzare tuttavia che la maggior parte dei soggetti della popolazione studiata fossero stati sterilizzati tardivamente, essendo la media di espressione recettoriale dell'intero tessuto mammario negli animali non interi non significativamente lontana da quella degli animali interi (Sorenmo *et al.*, 2000). Tali risultati non trovano studi simili in letteratura, in cui il numero di animali non interi inclusi nella popolazione oggetto di studio risulta solitamente esiguo e poche sono le classi istologiche rappresentate (Martin *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005; Toniti *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda le lesioni maligne, nonostante si fosse osservato un andamento decrescente della percentuale ed intensità d'espressione recettoriale da grado I a III, questo non è risultato statisticamente significativo. L'effetto del grading istologico sui valori medi di espressione percentuale risulta statisticamente significativo per entrambi i recettori qualora si escludano dalla valutazione il diametro tumorale e l'indice mitotico, indicando che il suo effetto è dipendente da quello di questi due fattori e ribadendo l'importanza del diametro tumorale (Yamagami *et al.*, 1996; Nieto *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005).

In merito alla prognosi è stata condotta un'analisi statistica che valuta come fattori incidenti sul tempo di sopravvivenza la percentuale di espressione di ER α e PR, la sterilizzazione, il diametro, i margini di escissione, l'invasione linfatica, e l'indice mitotico, ed è risultato statisticamente significativo l'effetto dell'invasione linfatica ($p=0,006$) e marginalmente quello dell'indice mitotico ($p=0,07$)

(Karayannopolou *et al.*, 2005). Contrariamente ai risultati di altri studi, l'espressione dei recettori ormonali, la sterilizzazione e il diametro non sono risultati fattori prognostici significativi (Nieto *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2005). In due studi immunoistochimici sull'espressione di ER α e PR, il valore prognostico dell'invasione linfatica è stato confermato in analisi statistica unifattoriale (Nieto *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005). Nello studio di Martin e collaboratori (2005) l'effetto dell'invasione linfatica non risulta statisticamente significativo nell'analisi multifattoriale qualora vengano inclusi nella valutazione il grading istologico ed il diametro tumorale, che risultano i fattori di maggior valore prognostico nel suo studio. Sul calo d'incidenza di mortalità registrata negli studi più recenti, Martin e collaboratori (2005) avanzano l'ipotesi che alla base di ciò possa essere considerata una migliore precocità alla diagnosi, essendo che, a differenza del tipo istologico, il valore prognostico del diametro rimane condiviso (Yamagami *et al.*, 1996; Nieto *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2005; Withrow & MacEwen, 2007). Nonostante nel presente studio il diametro non sia risultato di valore prognostico, si è notato che l'87% dei noduli era di dimensioni inferiori ai 3 cm e l'incidenza di mortalità a causa di tumore mammario nella popolazione studiata è del 18%. Valori di mortalità decisamente più alti (70%) venivano descritti nella letteratura non recente (Misdorp & Hart, 1976). Si sottolinea pertanto che la mancanza di una valenza prognostica del diametro tumorale in questo studio possa essere dovuta alla valutazione di tumori genericamente di dimensioni non elevate. Il *cut-off* prognostico in letteratura è infatti di 3 cm (Yamagami *et al.*, 1996; Withrow & MacEwen, 2007).

CONCLUSIONE

In questo studio si conferma la prevalenza delle neoplasie ormono-dipendenti nella specie canina, con frequenza di neoplasie ER α + e/o PR+ simile a quella nel tumore al seno (>65%), contrariamente invece alla specie felina (Hamilton *et al.*, 1976; Van Zwieten, 1984; Martin *et al.*, 2002). L'ormono-dipendenza del tumore mammario canino mette in luce la necessità di approfondire le terapie antirecettoriali (Marconato & Del Piero, 2005; Ahmad & Kumar, 2011).

A nostra conoscenza, questo è il primo studio che indaga 12 tipi istologici e le due sottopopolazioni di soggetti interi e non interi di numerosità raffrontabile. È

risultato che esistono delle differenze statisticamente significative tra le diverse classi istologiche, indicando la necessità di considerarle sempre separatamente e di raffrontarle in studi che considerino il medesimo sistema classificativo. Il fattore sterilizzazione è risultato influenzare in modo significativo l'espressione recettoriale di entrambi i recettori ormonali all'interno delle lesioni neoplastiche (Nieto *et al.*, 2000). Tuttavia i risultati di questo studio hanno messo in evidenza che né l'espressione recettoriale né la sterilizzazione abbiano una valenza prognostica. Certamente, la riduzione dell'espressione recettoriale si accompagna a tumori maligni e genericamente di diametro maggiore, ma non è apparentemente in grado di fornire informazioni prognostiche clinicamente significative. Ulteriori studi potrebbero essere condotti su un ugual numero di soggetti sterilizzati precocemente (entro il secondo ciclo) e tardivamente, per evidenziare eventuali differenze di espressione recettoriale legate al momento della sterilizzazione (Schneider *et al.*, 1969; Taylor *et al.*, 1976; Sorenmo *et al.*, 2000).

APPENDICE I

Staging delle neoplasie mammarie canine

Staging WHO originale (Owens, 1980):

T: tumore primario

(a: mobile, b: adeso alla cute, c: adeso al muscolo)

T₀: non c'è evidenza di tumore

T₁: diametro maggiore < 3 cm (a,b,c)

T₂: diametro maggiore 3-5 cm (a,b,c)

T₃: diametro maggiore > 5 cm (a,b,c)

T₄: carcinoma infiammatorio di qualunque diametro

N: stato dei linfonodi regionali

(a: mobile, b: adeso)

In seguito ad un esame clinico o istopatologico:

N₀: no metastasi

N₁: metastasi al linfonodo ipsilaterale (a,b)

N₂: metastasi ai linfonodi bilaterali (a,b)

M: metastasi a distanza

M₀: non riscontrate

M₁: riscontrate

Staging WHO modificato (Rutteman, 2001):*

T: tumore primario

T₁: diametro maggiore < 3 cm

T₂: diametro maggiore 3-5 cm

T₃: diametro maggiore > 5 cm

N: stato dei linfonodi regionali

In seguito ad esame istologico o citologico:

N₀: no metastasi

N₁: metastasi presente

M: metastasi a distanza

M₀: non riscontrate

M₁: riscontrate

Stage				Stage			
I	T _{1a,b,c}	N ₀	M ₀	I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₀	N ₁	M ₀	II	T ₂	N ₀	M ₀
	T _{1a,b,c}	N ₁	M ₀				
	T _{2a,b,c}	N ₀ o N _{1a}	M ₀				
III	T _{3a,b,c}	Qualsiasi N	M ₀	III	T ₃	N ₀	M ₀
	Qualsiasi T	Qualsiasi N _b	M ₀				
IV	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M ₁	IV	Qualsiasi T	N ₁	M ₀
No stage V				V	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M ₁

*Non include il carcinoma infiammatorio

APPENDICE II

Classificazione istologica WHO 1999

TUMORI MALIGNI

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

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

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

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

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

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

Tipi speciali di carcinoma

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

Carcinoma a cellule squamose: *carcinoma composto da isole e cordoni di cellule con aree di differenziazione squamosa. Questi tumori, alcuni dei quali sembrano originare dal canale del capezzolo, dovrebbero essere distinti dal carcinoma a cellule squamose derivante dalla cute e dagli*

annessi. Una possibile variante è il carcinoma adenosquamoso che spesso contiene anche strutture ghiandolari.

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

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

Sarcomi

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

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

Altri sarcomi

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

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

TUMORI BENIGNI

Adenoma

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

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

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

Fibroadenoma: *tumore benigno composto da cellule epiteliali luminali frammiste*

a cellule stromali e talvolta mioepiteliali. Si distinguono un fibroadenoma a bassa cellularità ed uno ad alta cellularità.

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

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

TUMORI NON CLASSIFICATI

IPERPLASIE/DISPLASIE MAMMARIE

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

Iperplasia lobulare

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

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

Cisti: sono di solito multiple. L'epitelio può essere atrofico o può mostrare qualche grado di iperplasia e crescita papillare.

Ectasia duttale: dilatazione progressiva del sistema duttale mammario. Quando viene interrotta la continuità epiteliale, materiale lipidico entra nel tessuto stromale e provoca una reazione da corpo estraneo. Può essere difficile differenziarla dalle cisti, comunque le dimensioni sono più piccole e generalmente si vede l'origine duttale.

Fibrosi focale (fibrosclerosi): La maggior parte delle displasie mostrano un certo grado di fibrosi. La fibrosi focale può accompagnare l'iperplasia lobulare e la proliferazione duttale.

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

APPENDICE III

Classificazione istologica "WHO-modificata" di Goldschmidt et al. 2011

NEOPLASIE EPITELIALI MALIGNI (CARCINOMI):

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

Carcinoma semplice: *carcinoma composto unicamente da cellule epiteliali luminali (da classificazione WHO con modifiche). Rispetto alla definizione originale della WHO vengono escluse le forme composte esclusivamente da cellule mioepiteliali maligne che vengono considerate separatamente (vedi mioepitelioma maligno). A seconda del pattern di distribuzione delle cellule epiteliali luminali si distinguono:*

Carcinoma tubulare: *cellule disposte in tubuli (da classificazione WHO).*

Carcinoma tubulo-papillare: *cellule disposte in tubuli e papille (da classificazione WHO).*

Carcinoma cistico-papillare: *cellule disposte in papille che si estendono all'interno di un lume tubulare cistico (da classificazione WHO).*

Carcinoma cribriforme: *cellule disposte in aree solide con presenza di numerose piccole aperture (pattern "a setaccio") (da classificazione WHO). È una forma molto frequente nel gatto.*

Carcinoma solido: *cellule disposte in nidi, cordoni e aree lobulari solide (da classificazione WHO).*

Carcinoma micropapillare invasivo: carcinoma con più del 50% delle cellule tumorali organizzate in piccoli aggregati o papille privi di asse fibrovascolare e spesso circondati da lacune stromali vuote. Le cellule, di forma cuboidale/poligonale, presentano moderato citoplasma intensamente eosinofilo e nucleoli prominenti (Cassali *et al.*, 2002; Gama *et al.*, 2008).

Carcinoma comedonico: carcinoma molto esteso, spesso multilobulato ed infiltrante, caratterizzato da cellule disposte in ampi lobuli separati da stroma connettivale e all'interno dei quali si riconoscono aree centrali di necrosi che generalmente coinvolgono più del 50% della popolazione neoplastica. Le aree necrotiche sono caratterizzate da accumulo di abbondante materiale amorfo eosinofilo frammisto a detriti cellulari, neutrofili degenerati e macrofagi schiumosi. Le cellule neoplastiche non necrotiche possono presentare pattern solido e occasionalmente tubulare o tubulo-papillare.

Carcinoma anaplastico: *carcinoma altamente infiltrante composto da cellule epiteliali pleomorfe, singole o in piccole aggregati, con nuclei bizzarri, talvolta multipli* (da classificazione WHO).

Carcinoma in adenoma complesso/tumore misto benigno: *tumore in cui si rinvengono foci distinti di cellule epiteliali maligne (carcinoma) all'interno di un adenoma complesso (carcinoma in adenoma complesso) o di un tumore misto benigno (carcinoma in tumore misto benigno)*. Le aree benigne sono chiaramente evidenti (da classificazione WHO).

Carcinoma complesso: *tumore composto da cellule epiteliali luminali maligne e da cellule mioepiteliali benigne* (da classificazione WHO con modifiche). Rispetto alla definizione WHO originale viene qui specificamente sottolineata la natura benigna delle cellule mioepiteliali che appaiono di forma fusata/stellata e presentano minimi aspetti di anisocitosi ed anisocariosi con rare o assenti figure mitotiche. Le cellule mioepiteliali sono organizzate in fasci e vortici interstiziali e sono spesso associate a depositi di matrice extracellulare lievemente basofila. Le cellule epiteliali luminali maligne possono invece presentare diversi pattern di distribuzione (solido, tubulare, tubulo-papillare).

Carcinoma e mioepitelioma maligno: *tumore in cui sia la componente epiteliale luminale che quella mioepiteliale sono maligne*. Rispetto ad un carcinoma complesso, le cellule identificabili come mioepiteliali possono mostrare aspetti

morfologici variabili e in ogni caso presentano anisocitosi ed anisocariosi più spiccate e un'attività mitotica più intensa. Le cellule epiteliali lumenali maligne possono invece presentare diversi pattern di distribuzione (solido, tubulare, tubulo-papillare).

Carcinoma misto: tumore in cui si riviene una componente epiteliale lumenale diffusamente maligna (carcinoma) associata ad una componente mioepiteliale benigna con aree di differenziazione cartilaginea e/o ossea. Rispetto al carcinoma in tumore misto benigno non sono evidenti aree in cui la componente epiteliale lumenale conserva caratteristiche di benignità.

Carcinoma duttale: questa è la controparte maligna dell'adenoma duttale (adenoma basaloide nella classificazione WHO). Il carcinoma duttale é composto da cellule organizzate in formazioni simil- cordonali e papillifere irregolari in cui è possibile rilevare occasionalmente la presenza di due file di cellule (lumenale e basale). Occasionalmente tra i cordoni si osservano spaccature lineariformi. È frequente inoltre riscontrare aree lumenali in differenziazione squamosa. Il termine carcinoma duttale è stato scelto per i numerosi aspetti morfologici che questo tumore ha in comune con il carcinoma duttale delle ghiandole apocrine del cane per il quale si ipotizza un'origine dalle strutture duttali (Gross *et al.*, 2005). Questo tumore non ha invece nulla a che vedere con il carcinoma duttale della mammella umana, che è invece un'entità che può presentare aspetti morfologici molto eterogenei (Robbins & Cotran, 2009).

Carcinoma papillare intraduttale: controparte maligna dell'adenoma papillare intraduttale (papilloma duttale nella classificazione WHO). La denominazione "papillare intraduttale" deriva dalla presenza di ampie proiezioni papillifere che prendono origine dalla parete di una o più strutture duttali ectasiche e appaiono esofitiche nel lume duttale. Tali papille sono rivestite da cellule epiteliali maligne con occasionali aree multifocali lumenali di differenziazione squamosa. Nello stroma connettivale di supporto si possono occasionalmente rilevare aree di minima proliferazione mioepiteliale con caratteristiche di benignità.

NEOPLASIE MALIGNI - TIPI SPECIALI:

Carcinoma a cellule squamose: *carcinoma composto da isole, cordoni e nidi di*

cellule squamose maligne (da classificazione WHO). È morfologicamente sovrapponibile al carcinoma squamoso cutaneo (Gross *et al.*, 2005).

Carcinoma adenosquamoso: *carcinoma a cellule squamose (vedi sopra) che presenta però in concomitanza aree indicative di un'origine ghiandolare (formazione di tubuli/papille)* (da classificazione WHO).

Carcinoma mucinoso: *carcinoma caratterizzato da abbondante produzione di mucina* (da classificazione WHO). Le cellule neoplastiche possono essere organizzate in tubuli e nidi e il materiale mucinoso è mucicarminio e PAS-diasiasi positivo. Questa neoplasia deve essere differenziata dal carcinoma complesso con abbondante presenza di matrice extracellulare basofila (Brunetti *et al.*, 2003).

Carcinoma con cellule ricche in lipidi (lipid-rich): *carcinoma composto da cellule con citoplasma ricco in lipidi neutri* (da classificazione WHO). Le cellule hanno organizzazione prevalentemente solida e presentano citoplasma abbondante contenente vacuoli multipli di piccole dimensioni o un vacuolo singolo ampio con dislocazione periferica del nucleo.

Tumori a cellule fusate:

Mioepitelioma maligno: *tumore costituito esclusivamente da cellule mioepiteliali maligne.* Gli aspetti morfologici sono analoghi a quelli descritti per il carcinoma e mioepitelioma maligno, eccetto che per l'assenza in questo caso di elementi epiteliali luminali.

Carcinoma squamoso a cellule fusate: *carcinoma composto da cellule squamose di forma fusata.* È morfologicamente sovrapponibile al carcinoma squamoso cutaneo a cellule fusate (Gross *et al.*, 2005).

Carcinoma-variante a cellule fusate: *carcinoma composto da cellule prevalentemente di forma fusata organizzate in isole e nidi* (da classificazione WHO).

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

Osteosarcoma

Fibrosarcoma

Condrosarcoma

Emangiosarcoma

Atri sarcomi

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

TUMORI BENIGNI:

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

Adenoma papillare intraduttale (papilloma duttale): *tumore benigno composto da papille intraduttali con asse fibrovascolare e con aree lumenali di differenziazione squamosa. Come nel caso del carcinoma papillare intraduttale, nello stroma connettivale di supporto si possono occasionalmente rilevare aree di minima proliferazione mioepiteliale con caratteristiche di benignità (da classificazione WHO con modifiche).*

Adenoma duttale (adenoma basaloide): *tumore benigno caratterizzato da cordoni intersecantisi a formare spaccature lineariformi e costituiti da cellule disposte su due file (luminale e basale). È frequente inoltre riscontrare aree lumenali in differenziazione squamosa (da classificazione WHO). Questo tumore è morfologicamente sovrapponibile all'adenoma duttale delle ghiandole apocrine (Gross et al., 2005).*

Fibroadenoma: *tumore benigno composto da cellule epiteliali lumenali organizzate in strutture tubulari allungate che sono circondate da abbondante stroma connettivale lasso, spesso edematoso e talvolta contenente occasionali elementi mioepiteliali (da classificazione WHO).*

Mioepitelioma: *raro tumore composto esclusivamente da cellule mioepiteliali con caratteristiche di benignità, organizzate in corti fasci e associate a matrice lievemente basofila.*

Adenoma complesso: *tumore composto da una componente epiteliale luminale e da una mioepiteliale, entrambe benigne (da classificazione WHO).*

Tumore misto benigno: *tumore benigno composto da una componente epiteliale luminale, da una componente mioepiteliale e da tessuto mesenchimale (cartilagine e/ o osso, raramente tessuto adiposo) (da classificazione WHO).*

IPERPLASIE / DISPLASIE:

Ectasia duttale: *dilatazione dei dotti interlobulari con possibile accumulo nel lume di secreto frammisto a detriti cellulari, a macrofagi schiumosi e a cristalli di colesterolo (da classificazione WHO).*

Iperplasia lobulare (adenosi): *proliferazione intralobulare non neoplastica caratterizzata da incremento del numero dei dotti intralobulari e degli alveoli. Le cellule che rivestono tali dotti e alveoli non presentano generalmente significativi aspetti di atipia (da classificazione WHO).*

Iperplasia lobulare classica: (vedi sopra).

Iperplasia lobulare con attività secernente: le cellule che tappezzano gli alveoli sono colonnari con citoplasma ampio e vacuolizzato. Nel lume alveolare si rileva presenza di materiale amorfo eosinofilo riferibile a secreto.

Iperplasia lobulare con fibrosi: si evidenzia incremento del tessuto connettivo stromale tra i lobuli iperplastici.

Iperplasia lobulare con aspetti di atipia: all'interno del lobulo iperplastico si rilevano alcuni aspetti di atipia quali presenza di mitosi, minima pluristratificazione delle cellule, ipercromasia nucleare, e lievi anisocitosi ed anisocariosi.

Epiteliosi: *densa proliferazione di cellule epiteliali dei dotti intralobulari che vanno a riempire il lume duttale. Queste cellule presentano nuclei ipercromatici, scarso citoplasma e lieve pleomorfismo (da classificazione WHO con modifiche). L'epiteliosi viene differenziata da forme di carcinoma in situ per l' anisocitosi e l'anisocariosi meno spiccate.*

Papillomatosi (iperplasia duttale): *proliferazione di cellule epiteliali dei dotti*

interlobulari con formazione di piccole papille prive di asse fibrovascolare (da classificazione WHO con modifiche). La papillomatosi, sulla base del ridotto pleomorfismo cellulare, deve essere differenziata da aree di carcinoma micropapillare invasivo.

Cambiamento fibroadenomatoso: *lesione morfologicamente simile al fibroadenoma che si sviluppa in seguito a stimolazione progestinica esogena o endogena, in particolare negli animali giovani. È una condizione molto rara nel cane, mentre si sviluppa con una certa frequenza nel gatto (da classificazione WHO).*

Ginecomastia: *ingrossamento delle ghiandole mammarie nei cani maschi, spesso in associazione a sertoliomi testicolari. Istologicamente si presenta come un quadro di iperplasia lobulare ed ectasia duttale (da classificazione WHO).*

APPENDICE IV

Informazioni anamnestiche dei 113 campioni oggetto di questo studio

N PROG	CODE	Sesso	Razza	Età	Noduli	Diametro	Live/ Dead	Causa morte CMT
1	454	f	meticcio	10	singolo	2	L	
2	1081	fc	pastore tedesco	9	multipli	0,7	D	no
3	1490	f	barboncino	10	multipli	1,8	D	sì
4	1532	fc	meticcio	13	singolo	1	L	
5	1944	f	barboncino	13	multipli	1,7	D	no
6	1954	fc	meticcio	10	multipli	1,3	L	
7	2050	f	golden retriever	nd	multipli	2	L	
8	2052	fc	meticcio	9	singolo	2	L	
9	2301	fc	meticcio	8	multipli	0,5	L	
10	2513	f	meticcio	8	singolo	0,7	L	
11	2560	f	meticcio	9	singolo	1	L	
12	2803	fc	barboncino	9	multipli	0,8	L	
13	2804	f	meticcio	8	multipli	1,5	L	
14	2831	fc	meticcio	13	multipli	0,8	L	
15	2846	fc	meticcio	10	multipli	2,2	L	
16	2918	f	yorkshire terrier	8	singolo	0,5	L	
17	2937	f	bulldog	9	singolo	2	D	sì
18	2967	fc	meticcio	15	singolo	0,9	L	
19	2977	f	yorkshire terrier	14	singolo	3	D	no
20	3156	f	meticcio	9	multipli	0,3	L	
21	3201	f	bassotto	12	multipli	0,2	L	
22	3204	f	pastore tedesco	8	multipli	1	D	sì
23	3240	f	nd	12	multipli	1,2	D	sì
24	3419	f	bassotto	nd	multipli	1,8	D	no
25	3496	f	golden retriever	8	singolo	1,8	L	
26	3580	f	meticcio	8	singolo	1,2	L	
27	3739	f	yorkshire terrier	8	multipli	0,5	L	
28	3782	f	nd	nd	multipli	0,8	L	
29	3810	fc	meticcio	13	multipli	2	D	sì
30	4118	f	yorkshire terrier	10	multipli	0,6	L	
31	4206	fc	meticcio	10	multipli	1,8	L	
32	4423	fc	meticcio	9	singolo	2	L	
33	4494	f	meticcio	8	singolo	2,2	L	
34	4870	fc	pastore tedesco	10	multipli	3	L	
35	5991	f	nd	9	multipli	1	L	
36	7038	fc	siberian husky	10	multipli	0,7	L	
37	7365	f	schnautzer gigante	7	multipli	3	L	

38	7856	fc	barbone nano	9	multipli	0,4	L	
39	8059	F	boxer	7	singolo	0,6	L	
40	8076	F	shitzu	9	multipli	1,6	L	
41	8333	Fc	maltese	9	singolo	0,4	L	
42	9041	F	pastore tedesco	8	multipli	2,3	L	
43	9101	F	meticcio	7	singolo	1,8	L	
44	9125	F	cocker spaniel	7	multipli	3	L	
45	9297	f	siberian husky	12	singolo	1,6	D	sì
46	10023	f	siberian husky	15	singolo	nd	D	sì
47	10571	f	meticcio	15	multipli	4	L	
48	10929	fc	siberian husky	3	multipli	0,6	L	
49	11787	fc	meticcio	10	multipli	1	L	
50	11869	f	flat coated retriever	7	singolo	1,3	L	
51	11939	fc	meticcio	3	singolo	0,5	D	sì
52	12599	fc	meticcio	14	singolo	2	L	
53	13128	fc	barbone	13	multipli	3,8	D	no
54	14262	f	beagle	6	multipli	0,7	L	
55	14858	fc	setter inglese	12	singolo	4	L	
56	14892	f	barboncino	9	singolo	0,3	L	
57	15412	fc	airedale terrier	10	singolo	3	L	
58	15443	f	yorkshire terrier	10	singolo	0,7	L	
59	15694	f	pintsher	4	singolo	0,7	L	
60	15717	f	meticcio	7	singolo	1,1	L	
61	15751	fc	akita inu	8	singolo	0,8	L	
62	15772	fc	meticcio	15	singolo	2,3	L	
63	15950	fc	meticcio	nd	singolo	8	D	sì
64	16004	fc	bassotto tedesco	7	singolo	0,4	L	
65	16007	f	meticcio	9	multipli	0,8	L	
66	16172	f	meticcio	9	singolo	0,6	L	
67	16418	f	barboncino	6	singolo	0,6	L	
68	16521	fc	pastore australiano	5	singolo	1	D	sì
69	16730	fc	meticcio	9	singolo	0,7	L	
70	16795	fc	meticcio	12	singolo	1,3	L	
71	17008	fc	border collie	nd	singolo	0,7	L	
72	17099	fc	meticcio	10	singolo	0,3	L	
73	17321	f	meticcio	10	singolo	0,2	L	
74	17492	fc	meticcio	14	singolo	0,5	L	
75	17645	fc	meticcio	10	singolo	0,2	L	
76	18119	fc	barboncino	10	singolo	0,5	L	
77	18132	f	nd	7	multipli	3	L	
78	18144	fc	cocker spaniel	12	singolo	2	D	sì
79	18287	fc	yorkshire terrier	13	singolo	3	L	
80	18531	fc	meticcio	12	multipli	2,6	L	
81	19067	fc	meticcio	8	singolo	1	L	

82	19237	fc	pastore tedesco	8	multipli	1,4	L	
83	19564	f	bassotto tedesco	9	multipli	1,3	L	
84	19642	fc	golden retriever	9	multipli	0,7	L	
85	19708	fc	setter inglese	7	multipli	0,7	L	
86	19915	fc	meticcio	8	multipli	0,6	L	
87	20436	f	bassotto	10	singolo	1,2	L	
88	20462	fc	meticcio	9	singolo	0,2	L	
89	20472	fc	beagle	7	singolo	0,7	L	
90	20554	f	meticcio	5	singolo	1,2	L	
91	20667	f	cocker spaniel	9	singolo	0,7	L	
92	20677	fc	meticcio	10	multipli	nd	L	
93	20691	f	pastore tedesco	3	singolo	nd	D	sì
94	20826	f	pastore tedesco	8	singolo	0,3	L	
95	20964	f	meticcio	8	singolo	1,5	L	
96	21027	fc	siberian husky	9	singolo	0,6	L	
97	21098	fc	epagneul breton	12	singolo	0,6	L	
98	21153	f	meticcio	11	multipli	1,5	L	
99	21178	fc	pastore tedesco	12	singolo	2	D	sì
100	21601	fc	barbone	14	singolo	3	D	sì
101	21689	f	jack russell terrier	10	singolo	0,8	L	
102	21716	fc	pastore tedesco	11	singolo	nd	D	sì
103	21839	f	nd	nd	singolo	1,5	D	no
104	22377	f	meticcio	10	singolo	0,8	L	
105	22559	fc	meticcio	11	singolo	1	L	
106	22570	fc	chin giapponese	10	singolo	2	D	sì
107	22812	fc	corso	6	singolo	1	L	
108	22819	f	Barboncino	13	multipli	2	D	sì
109	22826	f	pit bull	10	singolo	10	D	sì
110	22833	f	pastore tedesco	11	multipli	nd	D	sì
111	23452	f	meticcio	7	singolo	0,5	L	
112	24805	fc	meticcio	6	singolo	4	D	sì
113	24873	f	cocker spaniel	7	multipli	0,7	L	

N PROG: numero progressivo; CODE: codice identificativo; PR: recettore progesterinico; ERa: recettore estrogenico α ; Live/Dead: vivo/morto; CMT: tumore mammario canino; F: intero; FC: non intero; nd: non conosciuto.

APPENDICE V

*Risultati degli esami istopatologico ed immunoistochimico dei 113
campioni oggetto di questo studio*

N PROG	CODE	Class.	Grad.	% PR sano/ ip.	% PR neopl.	Int. PR neopl.	% ER α sano/ ip.	% ER α neopl.	Int. ER α neopl.
1	454	SCMM	I	0	0	0	0	0	0
2	1081	STPC	I	77,6	3,2	1	66,3	3	1
3	1490	CC	I	45,2	0,4	2	41,6	0	0
4	1532	CC	I	50	0	0	66,8	0	0
5	1944	CC	I	35	6,7	3	28,5	6	3
6	1954	SCMM	I	57,7	2	2	59,4	2,5	2
7	2050	CoC	II	3	0	0	76,3	0	0
8	2052	SCMM	I	60,2	8,3	3	59,3	14,4	3
9	2301	SAD	-	52,2	49,3	3	55,1	55,8	5
10	2513	BMT	-	54	51,5	3	38	52,1	3
11	2560	BMT	-	44	0	0	49,4	5,2	3
12	2803	CAD	-	31,1	25	3	48,3	48,6	3
13	2804	CC	I	18,6	18,4	3	75,7	4,8	2
14	2831	CAD	-	56,8	47,7	3	57,3	47,2	3
15	2846	CC	II	0	7	1	0	6,8	2
16	2918	BMT	-	41	5,3	3	0	6,8	3
17	2937	CoC	III	44,7	0	0	46,2	0	0
18	2967	STC	II	30,5	22,9	2	41,7	15,4	1
19	2977	SCMM	I	49	0	0	78,3	3,8	4
20	3156	STC	I	35	52,3	3	87,6	49	3
21	3201	SSC	II	36,4	1,4	3	66,2	0	0
22	3204	IDPC	I	50,2	43,3	3	35,9	35,3	3
23	3240	CoC	II	41,4	0	0	65	0	0
24	3419	STPC	I	74,5	11,9	2	72,2	4,5	3
25	3496	STPC	I	40,6	0	0	57,8	2,7	2
26	3580	BMT	-	57	47,9	3	60,6	46,7	2
27	3739	STC	I	37	49,5	3	53,5	42,7	3
28	3782	SCMM	I	20,5	26	3	37,1	29	3
29	3810	SSC	III	50,8	0	0	47,3	0	0
30	4118	CAD	-	nd	0	0	nd	0	0
31	4206	CC	I	54,8	0	0	56,8	3,3	2
32	4423	CC	I	0	34,8	3	0	33,6	3
33	4494	STC	II	62	78,2	4	52,2	93,1	4
34	4870	CinBMT	I	46,7	5,8	2	60,9	4,3	2
35	5991	CC	I	58	0,8	3	72,9	1	3
36	7038	CoC	III	nd	0	0	nd	0	0
37	7365	SCMM	I	13	0	0	80	0	0

38	7856	CC	I	50,7	52,7	2	40,8	48	1
39	8059	CC	I	20,8	43	3	87	32,3	2
40	8076	STPC	II	50,7	0	0	21,3	1	3
41	8333	STC	I	50,8	9,3	2	46,5	3	2
42	9041	CinBMT	I	48,9	6,6	2	47,8	7,2	2
43	9101	CinBMT	I	46	12,3	2	85	11	2
44	9125	CC	I	21,9	1,4	1	33,9	3,9	1
45	9297	STPC	III	47,3	81	3	46,6	83,2	3
46	10023	AC	III	50	0,3	1	43	2,1	2
47	10571	CoC	III	51,7	7,1	1	55,7	0	0
48	10929	STPC	I	53,3	22,3	3	48,5	20,1	3
49	11787	CinBMT	I	69,1	0	0	71,5	0	0
50	11869	SCMM	I	33,7	0	0	80,4	0	0
51	11939	SCMM	I	49	0	0	41	0	0
52	12599	STPC	II	48	0	0	46,4	0	0
53	13128	CoC	III	55	0	0	83,1	0	0
54	14262	CinBMT	I	45,4	32,1	3	71,1	28,1	3
55	14858	SCMM	I	46,2	0	0	46,5	0	0
56	14892	STC	I	38,5	48,7	3	58	6,1	3
57	15412	SCMM	I	1,3	0	0	53	2,5	2
58	15443	CAD	-	45,6	57,4	2	48,6	61,5	3
59	15694	CAD	-	38,7	48,1	2	37,3	50,8	3
60	15717	CinBMT	I	nd	15,8	3	87,8	16,5	2
61	15751	BMT	-	53,6	60,3	3	48,6	59,3	2
62	15772	STPC	II	51,6	0	0	54,5	0	0
63	15950	AC	III	55	7,3	1	61	7	3
64	16004	BMT	-	56	35,9	3	56,6	42,3	2
65	16007	IDPC	I	50,4	18,6	2	70	21,3	2
66	16172	SAD	-	46,3	44,8	2	79,6	45,8	2
67	16418	BMT	-	42,4	56	3	53,5	57,8	3
68	16521	AC	III	nd	0,3	1	nd	0,1	1
69	16730	CAD	-	47,4	4,1	1	45,1	10,9	1
70	16795	BMT	-	50,6	44,7	3	58,7	45,5	4
71	17008	STPC	I	49,3	5,3	2	51,3	5	3
72	17099	BMT	-	46,4	1,1	2	56,2	4	2
73	17321	BMT	-	48,2	19	3	24	0	0
74	17492	BMT	-	49,8	0	0	43,3	1	2
75	17645	CAD	-	8,8	30,6	1	70,3	26,4	1
76	18119	BMT	-	50,8	30,4	3	53,25	20,3	3
77	18132	CoC	III	50	5	2	nd	11,4	3
78	18144	SSC	III	54	0	0	64,1	1,3	2
79	18287	SCMM	I	57,5	0	0	61,5	0	0
80	18531	CinBMT	I	45,3	0	0	37	1,5	1
81	19067	CinBMT	I	48,3	4,4	3	48,4	16,1	3

82	19237	CinBMT	I	58,1	6,5	2	60,6	16,8	3
83	19564	CC	I	39,9	14,3	3	54,2	23,2	2
84	19642	IDPC	I	57,5	0	0	61,7	0	0
85	19708	CC	I	7,8	46,8	3	82,5	7,3	2
86	19915	STC	I	57	47,9	3	58,7	54,1	3
87	20436	CAD	-	45,3	34,1	3	46,9	28,1	3
88	20462	SAD	-	52,4	9,8	3	55,1	55,8	5
89	20472	IDPC	II	0	10,6	3	0	15,4	3
90	20554	CAD	-	49,9	46,9	3	57,9	46,6	3
91	20667	SAD	-	22,7	16,7	3	68,2	5	2
92	20677	CinBMT	I	54,3	22,7	3	47,2	11,9	1
93	20691	SSC	III	nd	0	0	nd	0	0
94	20826	SAD	-	52,4	54,4	3	62,6	54,6	3
95	20964	CAD	-	61,6	51,2	3	64,6	50,8	3
96	21027	SAD	-	52,4	0,5	2	59,4	1,6	3
97	21098	SAD	-	56,2	58,9	4	53,9	54,6	4
98	21153	CinBMT	II	53,9	14,6	3	78,9	13,9	2
99	21178	CoC	III	nd	0	0	nd	0	0
100	21601	AC	III	46,7	0	0	45	0	0
101	21689	SAD	-	47,8	54,2	3	55,9	53,4	3
102	21716	SSC	III	56,9	1	1	48,4	0	0
103	21839	CinBMT	I	51,5	45	4	80,6	47,4	3
104	22377	SAD	-	54,7	48,1	2	72,6	9	2
105	22559	CAD	-	59,6	59,1	3	57	52,5	3
106	22570	CoC	III	35,8	0	0	51,2	0	0
107	22812	CAD	-	36,4	49,2	2	56	48	2
108	22819	SSC	III	40,6	0	0	40,4	14	4
109	22826	AC	III	59,4	0	0	61,4	0	0
110	22833	AC	III	54	0	0	73,8	0	0
111	23452	SAD	-	50,3	56,6	2	51,3	56,4	2
112	24805	IDPC	III	34	0	0	30	0	0
113	24873	IDPC	II	40,7	37,3	2	55,3	28	1

N PROG: numero progressivo; CODE: codice identificativo; CLASS.: classificazione istologica; GRAD.: grading istologico; PR: recettore progesterinico; ERa: recettore estrogenico α ; ip.: iperplastico; neopl: neoplastico; Int.: intensità; nd: non conosciuto.

AC: carcinoma anaplastico; BMT: tumore misto benigno; CAD: adenoma complesso; CC: carcinoma complesso; CinBMT: carcinoma e tumore misto benigno; CoC: carcinoma comedonico; IDPC: carcinoma intraduttale papillare; SAD: adenoma semplice; SCMM: carcinoma e mioepitelioma maligno; SSC: carcinoma solido semplice; STC: carcinoma tubulare semplice; STPC: carcinoma tubulo-papillare semplice.

APPENDICE FOTOGRAFICO

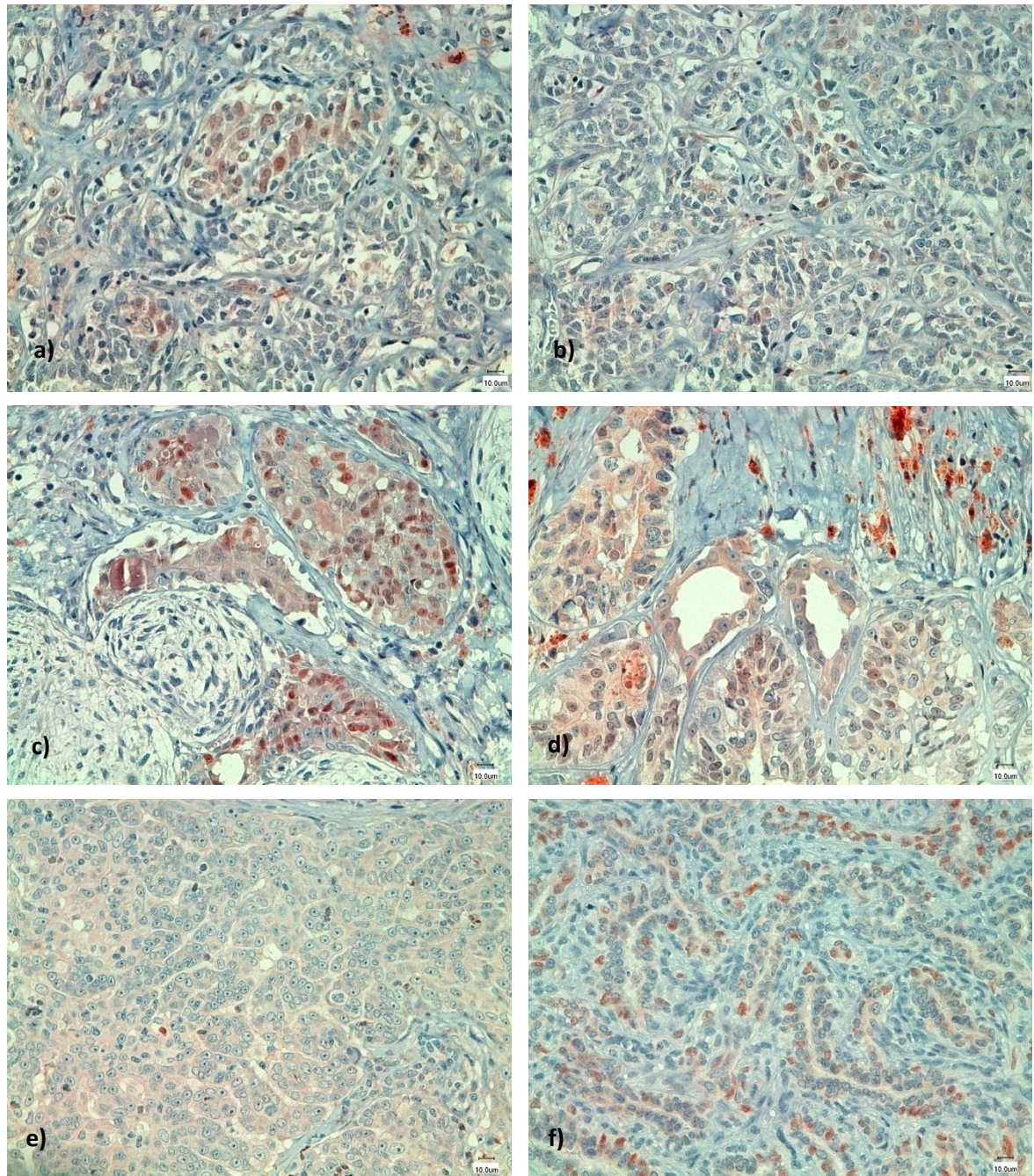


Figura 1: a) e b) Carcinoma e mioepitelioma maligno, ghiandola mammaria cane FC. a) IHC ER α pos. 2,5% (40X). b) IHC PR pos. 2% c) Tumore misto benigno, ghiandola mammaria cane F. IHC PR pos. 51,5% (40X). d) Carcinoma e tumore misto benigno, ghiandola mammaria cane FC. IHC PR pos. 4,4% (40X). e) Carcinoma anaplastico, ghiandola mammaria cane F. IHC ER α pos. 0% (40X). f) Carcinoma intraduttale papillare, ghiandola mammaria cane F. IHC ER α pos. 28% (40X). Pos.: positività cellulare.

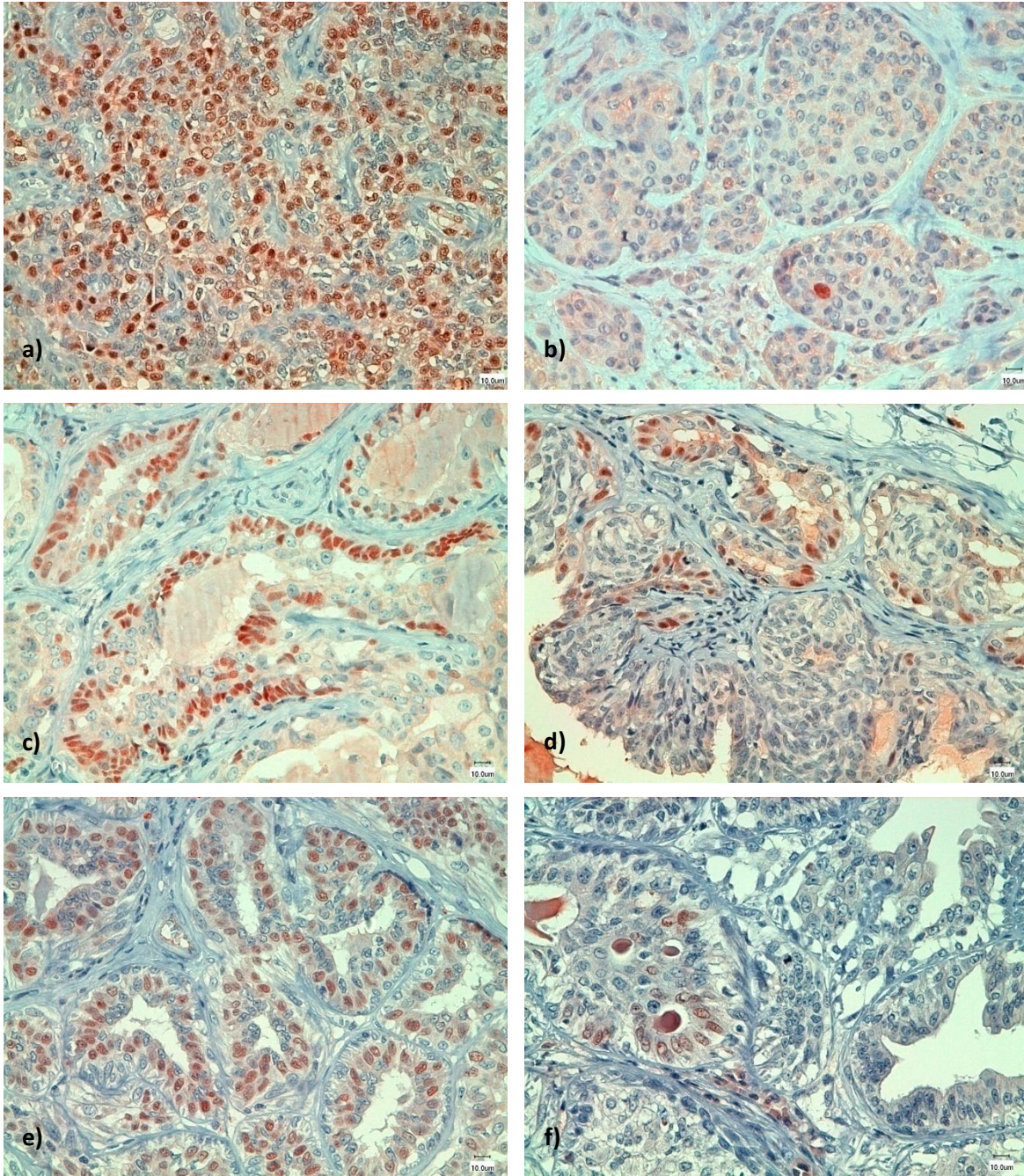


Figura 2: a) Adenoma semplice, ghiandola mammaria cane FC. IHC ER α pos. 55% (40X). b) Carcinoma solido semplice, ghiandola mammaria cane FC. IHC PR pos. 1% (40X). c) Adenoma complesso, ghiandola mammaria cane F. IHC PR pos. 46,9% (40X). d) Carcinoma complesso, ghiandola mammaria cane F. IHC PR pos. 14,3% (40X). e) Carcinoma tubulare semplice, ghiandola mammaria cane F. IHC PR pos. 49,5% (40X). f) Carcinoma tubulo-papillare semplice, ghiandola mammaria cane F. IHC PR pos. 11,9% (40X).

Pos.: positività cellulare.

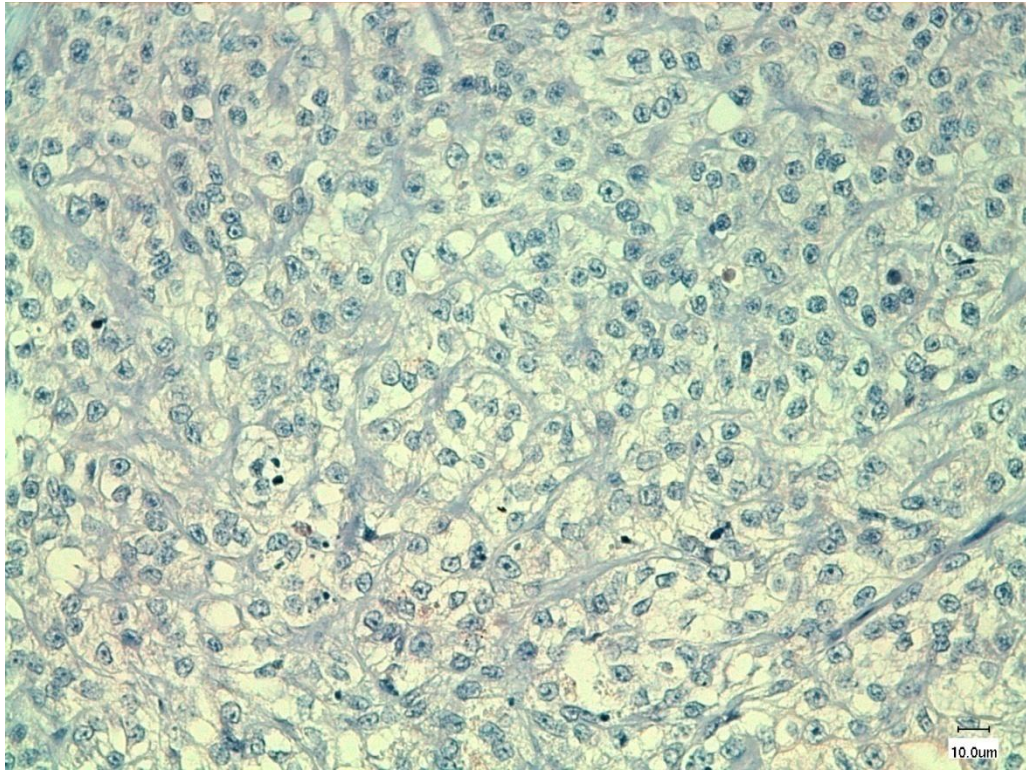


Figura 3: carcinoma comedonico, ghiandola mammaria cane F. Segnale negativo (intensità grado 0). IHC PR (40X).

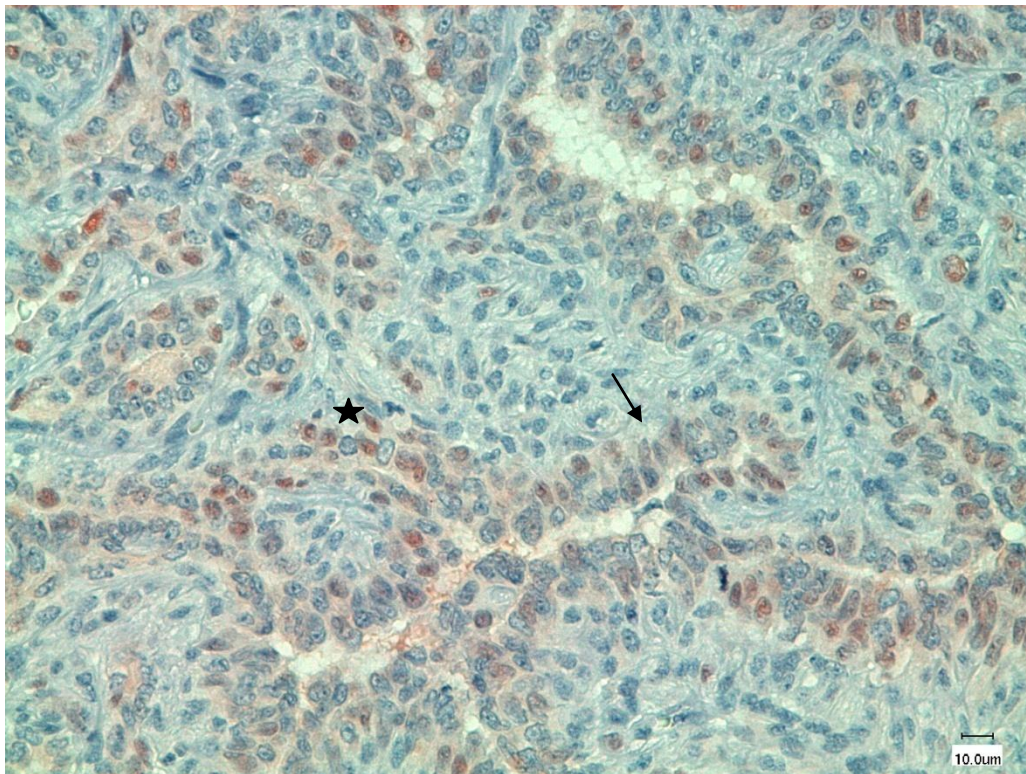


Figura 4: Carcinoma intraduttale papillare, ghiandola mammaria di cane F. Intensità grado 1 (freccia) e 2 (). IHC ER (40X).*

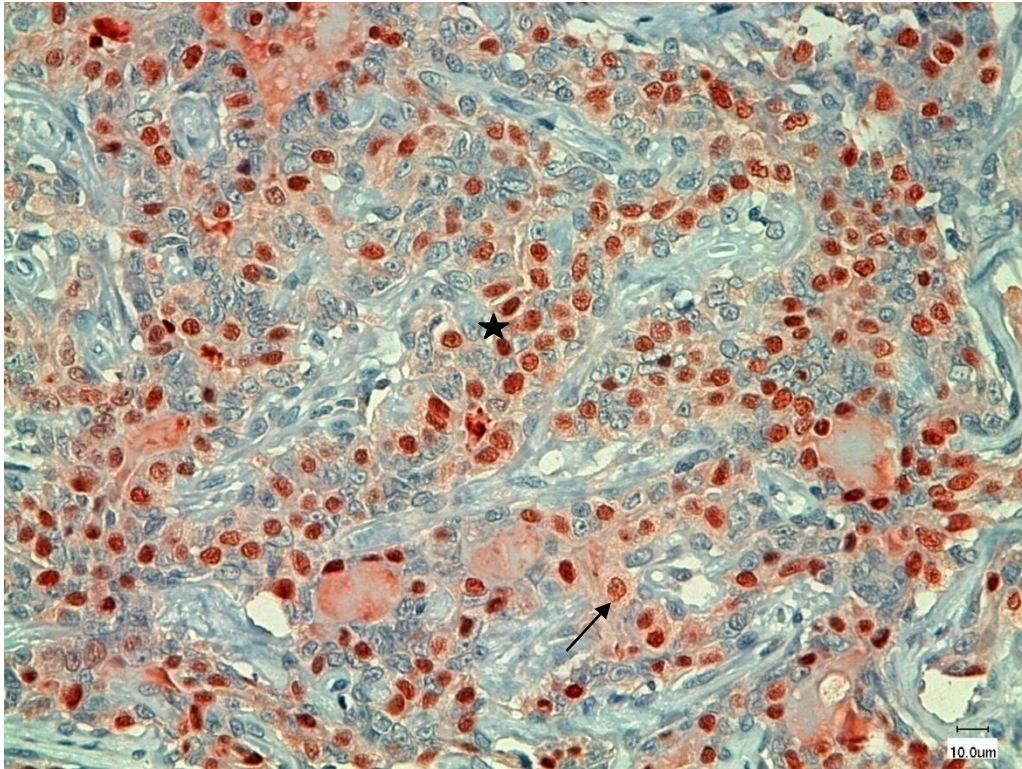


Figura 5: Adenoma semplice, ghiandola mammaria di cane F. Intensità grado 3 (freccia) e 4 (). IHC ER (40X).*

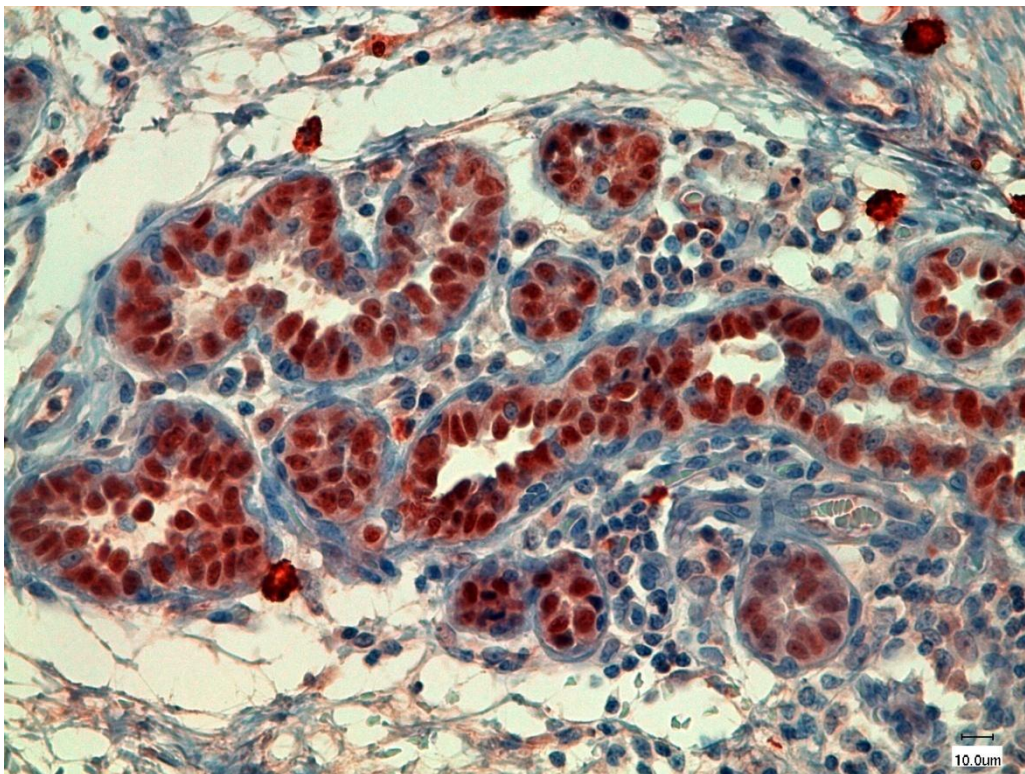


Figura 6: Tessuto sano, ghiandola mammaria di cane FC. Intensità grado 5. IHC ER (40X).

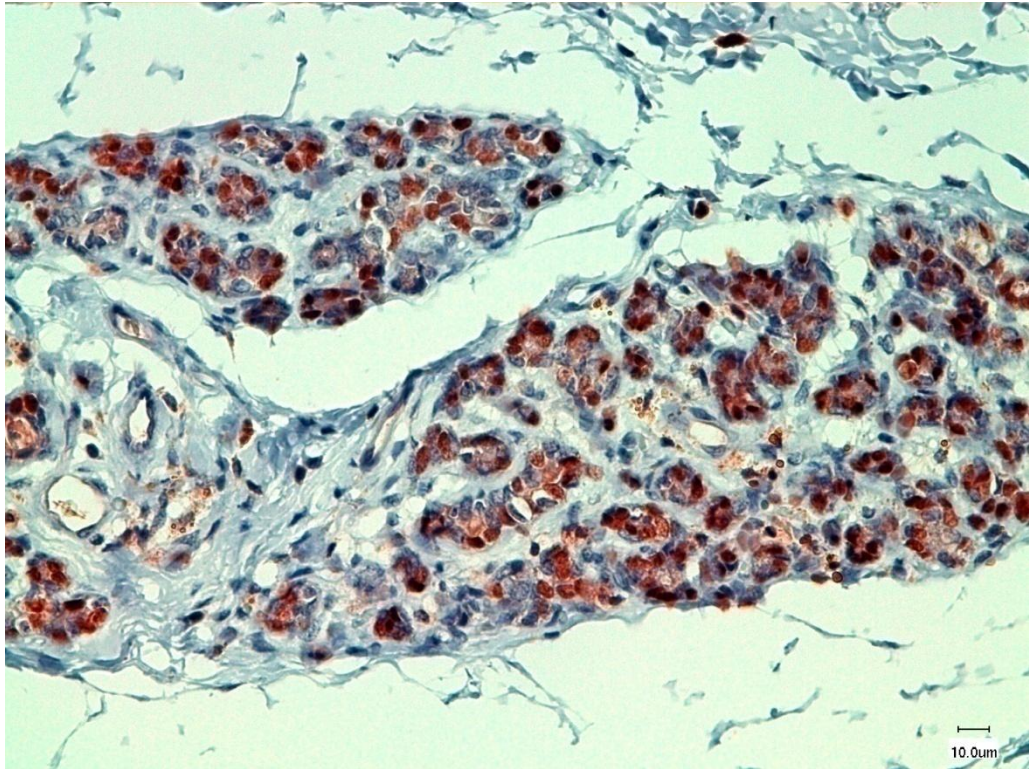


Figura 7: Tessuto sano, lobuli in regressione, ghiandola mammaria cane FC (stesso soggetto di Fig. 8). IHC PR (40X).

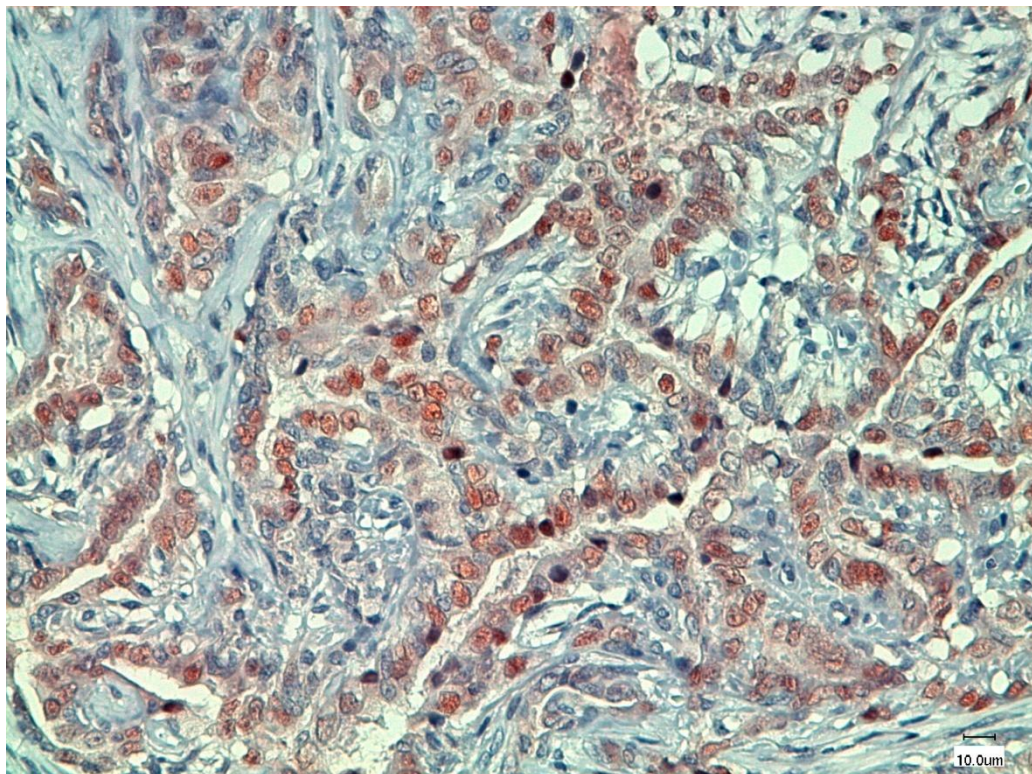


Figura 8: Adenoma complesso, ghiandola mammaria cane FC (stesso soggetto di Fig. 7). IHC PR (40X).

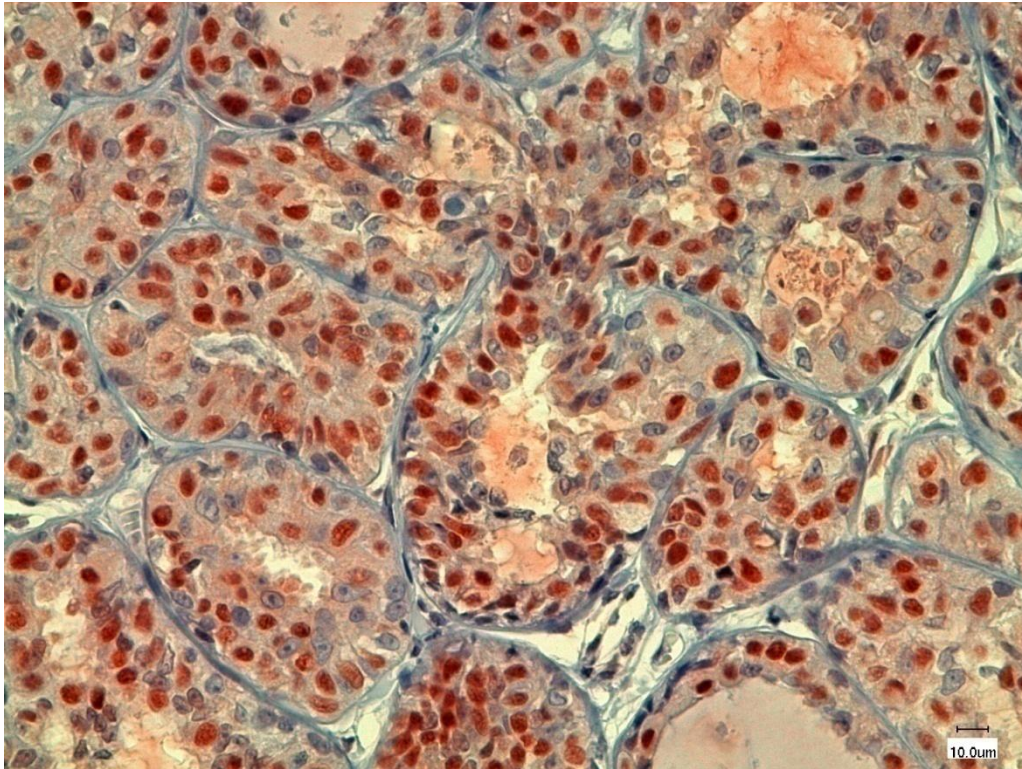


Figura 9: Tessuto iperplastico, ghiandola mammaria cane FC. IHC ER (40X).

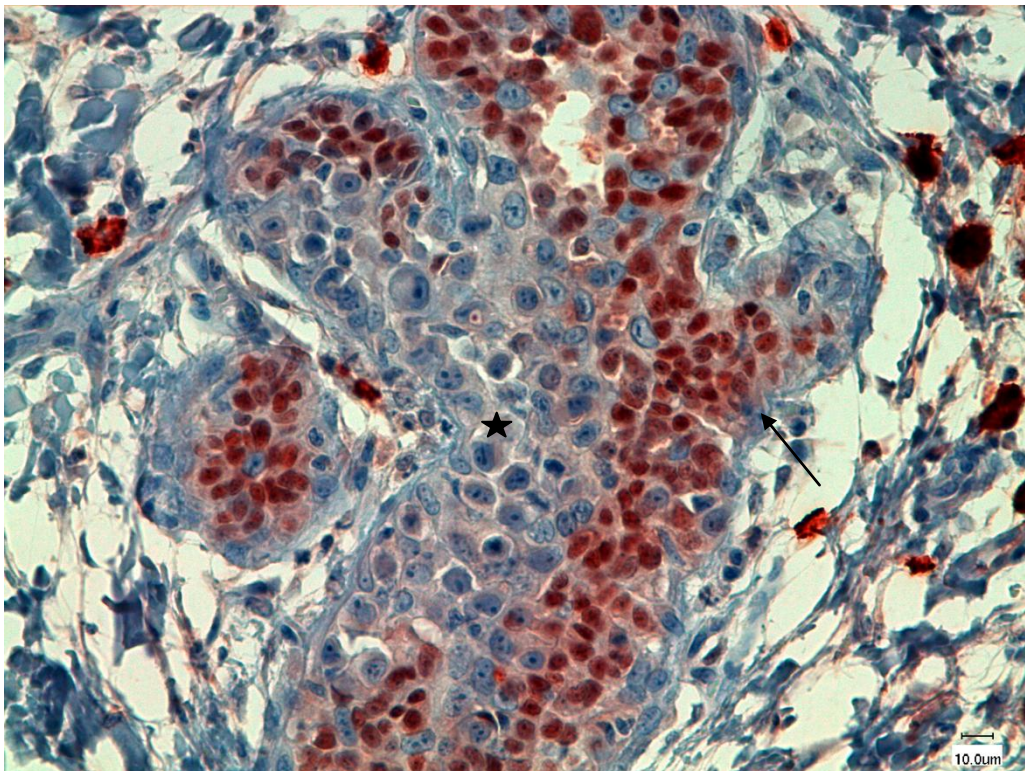


Figura 10: Tessuto sano/iperplastico (freccia) e carcinoma anaplastico (), ghiandola mammaria cane FC. IHC ER (40X).*

BIBLIOGRAFIA

- G. Aguggini, V. Beghelli, M.G. Clement, A. D'Angelo, A. Debenedetti, C. Facello, L.F. Giulio, R. Guglielmino, A. Lucaroni, G. Maffeo, A. Marongiu, S. Naitana, P. Nuvoli, R. Piazza. *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*. UTET editore, 2006, Capitolo 15, pp. 747–752.
- N. Ahmad, R. Kumar. *Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics*. *Cancer Letters*, 2011, 300:1–9.
- D.C. Allred. *Issues and updates: evaluating estrogen receptor- α , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer*. *Modern pathology*, 2010, 23:S52–S59.
- D.C. Allred, J.M. Harvey, M. Berardo, G.M. Clark. *Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis*. *Mod Pathol*, 1998, 11:155–168.
- F.H.E. Andrade, F.C. Figueiroa, P.R.O. Bersano, D.Z. Bissacot, N.S. Rocha. *Malignant mammary tumor in female dogs: enviromental contaminants*. *Diagnostic Pathology*, 2010, 5:45.
- C. Brisken, B. O'Malley. *Hormone action in the mammary gland*. *Cold-spring harb perspect boil*, 2010, 2:a003178.
- R.S. Brodey, I.J. Fidler, A.E. Howson. *The relationship of estrus cycle irregularity, pseudo-pregnancy, and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms*. *J Am Animal Hosp Assoc*, 1966, 149:1047–1049.
- R.S. Brodey, M.H. Goldschmidt, J.R. Roszel. *Canine mammary neoplasm*. *Journal of the american animal hospital association*, 1983, 19:61–90.
- B. Cardazzo, V. Zappulli, F. Frassinetti, T. Patarnello, M. Castagnaro, L. Bargelloni. *Full-length sequence and expression analysis of estrogen receptor α mRNA in feline mammary tumors*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 96:109–118.
- C.C. Chang, M.H. Tsai, J.W. Liao, P.W. Chan, M.L. Wong, S.C. Chang. *Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors*. *Javma*, 2009, 235(4): 391–396.

C.H. Chang, C.H. Liu, R. Conway, D.K. Han, K. Nithipatilom, O.C. Trifan, T.F. Lane, T. Hla. *Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase-2-induced breast cancer progression*. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101(2): 591–596.

S.C. Chang, CC. Chang, T.J. Chang, M.L. Wong. *Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumour: 79 cases (1998-2002)*. J Am Vet Med Assoc, 2005, 227:1625–1629.

M. Clemente, M.D. Pérez-Alenza, J.C. Illera, L. Pena. *Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer*. Vet Pathol, 2010, 47(2): 265–274.

C. Cocola, P. Anastasi, S. Astigiano, E. Piscitelli, P. Pelucchi, L. Vilaro, G. Bertoli, M. Beccaglia, M.C. Veronesi, S. Sanzone, O. Barbieri, R.A. Reinbold, G.C. Luvoni, I. Zucchi. *Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumour-initiating potential*. Reprod Dom Anim, 2009, 44(2):214–217.

T.C. De Ruijter, J. Veeck, J.P. De Hoon, M. von Engeland, V.C. Tjan-Heijnen. *Characteristics of triple-negative breast cancer*. J cancer res clin oncol, 2010, 137(2):183–192.

H.D. Dellman, J.A. Eurell, *Istologia e anatomia microscopica veterinaria*. Casa Editrice Ambrosiana, 2000, Capitolo 16, pp. 433–435.

R.B. Dickson, M.E. Lippman. *Hormonal control of human breast cancer cell lines*. Cancer Surveys, 1986 5:617.

S.F. Doisneau-Sixou, C.M. Sergio, J.S. Carroll, R. Hui, E.A. Musgrove, R.L. Sutherland. *Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells*. Endocrine-related cancer, 2003, 10:179–186.

I. Donnay, J. Ravis, N. Devleeschouwer, P. Wouters-Ballman, G. Leclercq, J. Verstegen. *Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs*. Am J Vet Res, 1995, 56:1188–1194.

K.M. Dyce, W.O. Sack, C.J.G. Wensing. *Testo di anatomia veterinaria*. Antonio Delfino Editore, 2006, capitolo 14, pp. 417–418.

ENCI (Ente Nazionale della Cinofilia Italiana, 2010), indirizzo homepage: www.enci.it. Ultimo accesso: 24/11/2011.

- D. Faratian. *Systems pathology*. Brast cancer research, 2010, 12(4):S4.
- FCI (Federazione Cinofila Internazionale, 2010), indirizzo homepage: www.fci.be.
Ultimo accesso: 24/11/2011.
- C. Finocchi, M. Ferrari. *Female reproductive steroids and neuronal excitability*. *Neurol Sci*, 2011, Suppl 1: S31–S35.
- E. Fisher, R. Sass, B. Fisher. *Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast project. Correlations with concordant and discordant estrogen and progesterone receptors*. *Cancer*, 1987, 59:1554.
- M. Geraldès, F. Gartner, F. Schmitt. *Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours*. *Veterinary Research*, 2000, 146:403–406.
- J. Gerdes, H. Pickartz, J. Brotherton, J. Hammerstein, H. Weitzel, H. Stein. *Growth fractions and estrogen receptors in human breast cancers as determined in situ with monoclonal antibodies*. *Am J Pathol*, 1987, 129:486–492.
- J. Gerdes, L. Li, C. Schlueter, M. Duchrow, C. Wohlenberg, C. Gerlach, I. Stahmer, S. Kloth, E. Brandt, H.D. Flad. *Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67*. *Am J Pathol*, 1991, 138:867–873.
- M. Goldschmidt, L. Pena, R. Rasotto, V. Zappulli. *Classification and grading of canine mammary tumours*. *Veterinary Pathology*, 2011, 48:117–131.
- J.M. Hamilton, R.W. Else, P. Forshaw. *Oestrogen receptors in feline mammary carcinomas*. *The Veterinary Record*, 1976, 99:477–479.
- D.W. Hayden, D.M. Barnes, K.H. Johnson. *Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats: a retrospective study*. *Veterinary Pathology*, 1989, 26, 104–113.
- E. Hellmen, A. Lindgren. *The accuracy of cytology in diagnosis and DNA analysis of canine mammary tumors*. *Journal of Comparative Pathology*, 1989, 101:443–450.
- E. Hellmen, R. Bergstrom, L. Holmberg, I.B. Splingberg, K. Hansson, A. Lindgren. *Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases*. *Vet Pathol*, 1993, 30:20–27.

B.E. Henderson, R. Ross, L. Bernstein. *Estrogens as cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award lecture*. Cancer Research, 1988, 48:246–253.

W.L. Hsu, H.Y. Lin, S.S. Chiou, C.C. Chang, S.P. Wang, K.H. Lin, S. Chulakasian, M.L. Wong, S.C. Chang. *Mouse mammary tumor virus-like nucleotide sequences in canine and feline mammary tumors*. J clin microbiol, 2010, 48(12):4354–4362.

B.S. Hulka, E.T. Liu, R.A. Lininger. *Steroid hormones and risk of breast cancer*. Cancer, 1994, 74(3):1111–1124.

Y.N. Ikhabar, G. Thordarson, I.G. Camarillo, F. Talamantes. *Differential expression of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein in epithelia and stroma of the mouse mammary gland at various physiological stages*. Journal of Endocrinology, 1999, 161:77–87.

J.C. Illera, M.D. Pérez Alenza, A. Nieto, M. A. Jiménez, G. Silvan, S. Dunner, L. Pena. *Steroids and receptors in canine mammary cancer*. Steroids, 2006, 71: 541–548.

A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, T. Murray, M.J. Thun. *Cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2008, 58:71–96.

M. Karayannopolou, E. Kaldrymidou, T.C. Constantinidis, A. Dessiris. *Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method*. J. Comp path, 2005, 133:246–252.

K.S. Korach, J.F. Couse, S.W. Curtis, T.F. Washburn, J. Lindzey, K.S. Kimbro, E.M. Eddy, A. Miglaccio, S.M. Snedeker, D.B. Lubahn, D.W. Schomberg, E.P. Smith. *Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes*. Rec Prog Horm Res, 1996, 51:159–186.

H.S. Kooistra, A.C. Okkens. *Secretion of Growth Hormone and Prolactin during Progression of the Luteal Phase in Healthy Dogs: a Review*. Mol Cell Endocrinol, 2002, 197:167–172.

H.L. La Marca, J.M. Rosen. *Minireview: hormones and mammary cell fate – what will I become when I grow up?* Endocrinology, 2008, 149(9): 4317–4321.

J.P. Lyndon, F.J. De Mayo, C.R. Funk, S.K. Mani, A.R. Hughes, C.A. Montgomery, G. Shyamala, O.M. Conneely, B.W. O'Malley. *Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities*. Genes Dev. 1995, 9:2266–2278.

- E.G. MacEwen, A.K. Patnaik, H.J. Harvey, W.B. Panko. *Estrogen receptors in canine mammary tumors*. Cancer Res, 1982, 42:2255–2259.
- S. Mallepell, A. Krust, P. Chambon, C. Brisken. *Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor α is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 2196–2201.
- L. Marconato, F. Del Piero. *Tumori mammari nel cane*. Tratto da Oncologia Medica dei Piccoli Animali, ed. Poletto, 2005, capitolo 22, pp. 440–459.
- J. Martin de las Mulas, M. van Niel, Y. Millan, J. Ordas, M.A. Blankenstein, F. van Mil, W. Misdorp. *Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumourous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status*. Research in Veterinary Science, 2002, 72:153–161.
- J. Martin de las Mulas, Y. Millan, R. Dios. *A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog*. Vet Pathol, 2005, 42:200–212.
- 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, 79:225–232.
- F. Millanta, S. Citi, D. Della Santa, M. Porciani, A. Poli. *Cox-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers*. Breast Cancer Research and Treatment, 2006, 98: 115–120.
- W. Misdorp, E. Cotchin, J.F. Hampe, A.G. Jabara, J. von Sandersleben. *Canine malignant mammary tumours: I. Sarcomas*. Vet Pathol, 1971, 8:99–117.
- W. Misdorp, E. Cotchin, J.F. Hampe, A.G. Jabara, J. von Sandersleben. *Canine malignant mammary tumours: II. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas*. Vet Pathol, 1972, 9:447–470.
- W. Misdorp, E. Cotchin, J.F. Hampe, A.G. Jabara, J. von Sandersleben. *Canine malignant mammary tumours: III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumours*. Vet Pathol, 1973, 10:241–256.

W. Misdorp, A.A.M. Hart. *Prognostic factors in canine mammary cancer*. J Natl Cancer Inst, 1976, 56:779–786.

W. Misdorp, R.W. Else, E. Hellmen, T.P. Lipscomb. *Histologic classification of mammary tumors of the dog and the cat*. Armed Force Institute of Pathology 2nd ser. vol.7 and World Health Organization, Washington, DC, 1999.

W. Misdorp. *Tumors of the mammary gland*. In: D.J. Meuten ed. *Tumors in domestic animals*. 4th edition ed. Ames, IA: Iowa State Press, 2002, pp.575-606, 764.

S.K. Mohsin, H. Weiss, T. Havighurst, G.M. Clark, M. Berardo, L.D. Roanh, T.V. To, Q. Zho, R.R. Love, D.C. Allred. *Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study*. Mod Pathol, 2004, 17: 1545-1554.

J.E. Moulton. *Tumors of the Mammary Gland*. J.E. Moulton (ed), *Tumors in Domestic Animals*. University of California Press, Los Angeles, 1990, pp. 518–552.

E.A. Musgrove, C.S.L. Lee, R.L. Sutherland. *Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor α , epidermal growth factor receptor, c-fos and c-myc genes*. Mol. Cell. Biol. 1991, 11: 5032–5043.

M.C. Neville e C.W. Daniel. *The mammary gland: development, regulation and function*. Plenum Press, New York, 1987, Cap. Postnatal development of the rodent mammary gland, a cura di C.W. Daniel e G.B. Silberstein, pp. 3–36.

A. Nieto, L. Pena, M.D. Pérez-Alenza, M.A. Sanchez, J.M. Flores, M. Castano. *Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance*. Vet pathol, 2000, 37:239–247.

D.C. Orfanou, A. Pourlis, H.N. Ververidis, V.S. Mavrogianni, I.A. Taitzoglou, C.M. Boscós. *Histological features in the mammary glands of female dogs throughout lactation*. Journal of Veterinary Medicine, Anat. Histol. Embryol. 2010, 39:473–478.

L.N. Owens. *Classification of tumors in domestic animals*. 1st ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1980.

M.N. Patsikas, A. Dessiris. *The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: The first, second, fourth, fifth mammary glands*. Anat Histo Embryol, 1996, 25:131–138.

- M.N. Patsikas, A. Dessiris. *The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part II: the third mammary gland.* Anat Histo Embryol, 1996, 25:139–143.
- M.N. Patsikas, M. Karayannopoulou, E. Kaldrymidoy, L.G. Papazoglou, P.L. Papadopoulou, S.I. Tzegas, N.E. Tziris, D.G. Kaitzis, A.S. Dimitriadis, A.K. Dessiris. *The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study.* Anat Histo Embryol, 2006, 35:228–234.
- L. Pena, A. Nieto, M.D Pérez-Alenza, P. Cuesta, M. Castano. *Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathological variables.* J Vet Diagn Invest, 1998, 10:237–245.
- M.D. Pérez-Alenza, G.R. Rutteman, L. Pena: *Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study.* J Vet Intern Med, 1998, 12:132–139.
- M.D. Pérez-Alenza, L. Pena, N. Del Castillo, A.I. Nieto. *Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours.* Journal of Small Animal Practice, 2000, 41:287–291.
- J.C. Philibert, P.W. Snyder, N. Glickman, L.T. Glickman, D.W. Knapp, D.J. Waters . *Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary tumors.* J Vet Intern Med, 2003, 17:102–106.
- 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):301–313.
- F.L. Queiroga, M.D. Pérez-Alenza, G. Silvan, L. Pena, C. Lopes, J.C. Illera. *Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer.* Journal of steroid biochemistry & molecular biology, 2005, 94:181–187.
- F.L. Queiroga, M.D. Pérez-Alenza, G. Silvan, L. Pena, J.C. Illera. *Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer.* Journal of steroid biochemistry & molecular biology, 2009, 115:9–13.
- E.A. Rakha, M.E. El-Sayed, J. Reis-Filho, I.O. Ellis. *Patho-biological aspects of basal-like breast cancer.* Breast cancer res treat, 2009, 113:411–422.
- E.A. Rakha, J.S. Reis-Filho, F. Baehner, D.J. Dabbs, T. Decker, V. Eusebi, S.B. Fox, S. Ichihara, J. Jacquemier, S.R. Lakhani, J. Palacios, A.L. Richardson, S.J. Schnitt, F.C.

Schmitt, P.H. Tan, G.M. Tse, S. Badve, I.O. Ellis. *Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade*. Breast Cancer Research, 2010, 12:207.

R. Rasotto. Aspetti classificativi, epidemiologici, prognostici del tumore mammario del cane. Tesi di dottorato, 2011, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Padova.

R. Rasotto, V. Zappulli, M. Castagnaro, M.H. Goldschmidt. *A retrospective study of those parameters predictive of invasion of the lymphatic system of canine mammary carcinomas*. Vet Path, 2011, pubblicato online.

S. Rehm, D.J. Stanislaus, A.M. Williams. *Estrous Cycle-Dependent Histology and Review of Sex Steroid Receptor Expression in Dog Reproductive Tissues and Mammary Gland and Associated Hormone Levels*. Birth Defects Research (Part B), 2007, 80:233–245.

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

K. Roarty, J.M. Rosen. *Wnt and mammary stem cells: hormones cannot fly wingless*. Current Opinion in Pharmacology, 2010, 10:643–649.

G.R. Rutteman, W. Misdorp, M.A. Blankenstein, W.E. Van den Brom. *Oestrogen (ER) and progesterin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states*. Br J Cancer, 1988, 58:594–599.

G.R. Rutteman, S.J. Withrow, E.G. MacEwen. *Tumors of the mammary gland*. In: Small Animal Clinical Oncology, ed. S.J. Withrow & E.G. MacEwen, 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia, PA, 2001 .

C.F. Saba, K.S. Rogers, S.J. Newman, G.E. Mauldin, D.M. Vail. *Mammary gland tumours in male dogs*. J Vet intern med, 2007, 21:1056–1059.

Z.J. Sahab, Y. Man, S.W. Byers, Q.A. Sang. *Putative biomarkers and targets of estrogen receptor negative human breast cancer*. Int J Mol Sci, 2011, 12:4504–4521.

M. Santos, R. Marcos, A.M.R. Faustino. *Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle*. Reprod Dom Anim, 2010, 45:146–154.

G. Sarli, R. Preziosi, C. Benazzi, G. Castellani, P.S. Marcato. *Prognostic value of*

histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. J Vet Diagn Invest, 2002, 14:25–34.

F. Sassi, C. Benazzi, G. Castellani, G. Sarli. *Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry.* BMC Veterinary Research, 2010, 6:5.

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

F.C. Schmitt. *Multistep progression from an oestrogen-dependent growth towards an autonomous growth in breast carcinogenesis.* European journal of cancer, 1995, Vol 31A, 12:2049–2052.

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

D.R.J. Snead, J.Bell, A.R. Dixon, R.I. Nicole, C.W. Elston, R.W. Blamey, I.O. Ellis. *Methodology of immunohistochemical detection of estrogen receptor in human breast carcinoma in formalin-fixed paraffin embedded tissue: a comparison with frozen methodology.* Histopathology, 1993, 23:233–238.

K.U. Sorenmo, F.S. Schofer, M.H. Goldschmidt. *Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma.* Journal Vet Intern Med, 2000, 14:266–277.

K.U. Sorenmo, V.M. Kristiansen, M.A. Cofone, F.S. Shofer, A.M. Breen, M. Langeland, C.M. Mongil, A.M. Grondahl, J. Teige, M.H. Goldschmidt. *Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence.* Vet Comp Oncol, 2009, 7:162–172.

K.U. Sorenmo, R. Rasotto, V. Zappulli, M.H. Goldschmidt. *The development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms.* Vet. Pathol. 2011, Jan;48(1):85–97.

J. Stingl. *Detection and analysis of mammary gland stem cells.* J Pathol, 2009, 217: 229–241.

R.L. Sutherland, O.W.J. Prall, C.K.W. Watts, E.A. Musgrove. *Estrogen and progestin regulation of cell cycle progression.* Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 1998, 3(1):63–72.

- G.N. Taylor, L. Sahestari, J. Williams, W.A. Mays, S. MacFarland. *Mammary neoplasia in a closed beagle colony*. *Cancer Research*, 1976, 36:2740–2743.
- W. Toniti, S. Buranasinsup, A. Kongcharoen, P. Charoonrut, P. Puchadapirom, C. Kasorndorkbua. *Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2009, 10:907–911.
- J. Thuróczy, G.J.K. Reisvaag, E. Perge, A. Tibold, J. Szilágyi, L. Balogh. *Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours*. *Journal of Comparative Pathology*, 2007, 137:122–129.
- E. Van Garderen, J.A. Schalken. *Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system*. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 197:153–165.
- M.J. Van Zwieten. *General discussion, including brief review of animal models in breast cancer research: the dog*. In: *The rat as an animal model in breast cancer research*, Martinus Nijhoff publishers, Boston, 1984, pp. 215–217.
- R. Vihko, O. Janne, K. Kontula, P. Syrjala. *Female sex steroid receptor status in primary and metastatic breast carcinoma and its relationship to serum steroid and peptide hormone levels*. *Int J Cancer*, 1980, 26:13.
- C.J. Watson, W.T. Khaled. *Mammary Development in the Embryo and Adult: a Journey of Morphogenesis and Commitment*. *Development*, 2008, 135:995–1003.
- P.H. Wiebe. *Progesterone metabolites in breast cancer*. *Endocrine-Related Cancer*, 2006, 13:717–738.
- S.J. Withrow, E.G. MacEwen. *Small animal clinical oncology*. Saunders Elsevier, 3rd edition, ristampa del 2007, cap. 26, pp. 619–627.
- J. L. Wittliff. *Steroid-hormone receptors in breast cancer*. *Cancer*, 1984, 53:630.
- T. Yamagami, T. Kobayashi, K. Takahashi. *Prognosis for canine malignant mammary tumours based on the TNM and histologic classification*. *J Vet Med Sci*, 1996, 58:1079–1083.

T. Yamagami, T. Kobayashi, K. Takahashi, M. Sugiyama. *Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours*. J Small Anim Pract, 1996, 37:462–464.

H. Yamashita, Y. Yando, M. Nishio, Z. Zhang, M. Hamaguchi, K. Mita, S. Kobayashi, Y. Fujii, H. Iwase. *Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer*. Breast Cancer, 2006, 13:74–83.

D.M.L. Zaidan. *The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: a promising outlook*. Vet J, 2008, 177:3–5.

Ringraziamenti

Al termine di questo lavoro trovo necessario manifestare la mia gratitudine a tutte le persone che in un modo o nell'altro hanno contribuito a condurmi alla realizzazione di questo progetto.

Ringrazio di cuore tutto il personale dell'area di Anatomia Patologica del Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria dell'Università di Padova, per il prezioso aiuto, la disponibilità, la pazienza e la gentilezza che non sono mai mancate nei miei confronti. In modo particolare voglio ringraziare la mia relattrice Prof. Valentina Zappulli, la Dott. Laura Cavicchioli, il Prof. Mauro Dacasto, la Dott. Roberta Rasotto, la Dott. Silvia Benali, la Dott. Rossella Zanetti, Enrico e Davide. Ringrazio il Prof. Paolo Carnier per il lavoro di analisi statistica dei dati della mia tesi.

Un ringraziamento sincero va ai miei compagni di università e agli amici di sempre, che in diversi modi mi sono stati d'aiuto e di conforto per molti anni.

Ringrazio in modo speciale la mia famiglia e Andrea, per la comprensione, il sostegno e l'affetto sincero nei miei confronti.

Marta Mainenti