



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Scuola di Dottorato in Medicina Veterinaria

Le neoplasie mammarie della cagna: valutazione clinica dei fattori di rischio e prognostici

Candidato: Dott.ssa Viola Maria Innocenti

Tutor: Prof. Iacopo Vannozzi

ANNO ACCADEMICO 2010 – 2011

RIASSUNTO	Pag.4
INTRODUZIONE	Pag.5
CAPITOLO I: ANATOMIA E FISIOLOGIA DELLA MAMMELLA DELLA CAGNA	Pag.8
1.1 EMBRIOGENESI, TOPOGRAFIA E STRUTTURA	Pag.9
1.2 EVOLUZIONE E CONTROLLO ORMONALE	Pag.11
1.3 IRRORAZIONE, INNERVAZIONE E DRENAGGIO LINFATICO	Pag.15
1.3.1 ARTERIE	Pag.15
1.3.2 VENE	Pag.15
1.3.3 VASI LINFATICI	Pag.16
1.3.4 NERVI	Pag.16
CAPITOLO II: FATTORI DI RISCHIO E PROGNOTICI DELLE NEOPLASIE MAMMARIE DELLA CAGNA	Pag.17
2.1 INCIDENZA	Pag.18
2.2 FATTORI DI RISCHIO	Pag.18
2.2.1 ETÀ	Pag.18
2.2.2 ASSETTO ORMONALE ENDOGENO	Pag.19
2.2.3 SOMMINISTRAZIONE IATROGENA DI SOSTANZE ORMONALI	Pag.19
2.2.4 ANAMNESI DI PSEUDOCIESI	Pag.20
2.2.5 NUMERO DI GRAVIDANZE, ETÀ DELLA PRIMA GRAVIDANZA, NUMERO DI CUCCIOLI	Pag.20
2.2.6 MUTAZIONE DI P53	Pag.20
2.2.7 FATTORI DIETETICI E STATO DI NUTRIZIONE	Pag.21
2.3 FATTORI PROGNOTICI	Pag.22
2.3.1 FATTORI PROGNOTICI LEGATI ALL'OSPITE	Pag.23
2.3.1.1 Razza e taglia	Pag.23
2.3.1.2 Sesso	Pag.24
2.3.1.3 Età	Pag.24
2.3.1.4 Alterazioni ematologiche	Pag.25
2.3.2 FATTORI PROGNOTICI CLINICI LEGATI ALLA NEOPLASIA	Pag.25
2.3.2.1 Localizzazione del tumore	Pag.25
2.3.2.2 Nodulo singolo vs noduli multipli	Pag.25
2.3.2.3 Dimensioni della neoplasia	Pag.25
2.3.2.4 Tempo di insorgenza della neoplasia	Pag.27
2.3.2.5 Velocità di crescita della neoplasia	Pag.28
2.3.2.6 Stato della cute sovrastante la neoplasia	Pag.28
2.3.2.7 Adesione della neoplasia ai piani sottostanti (mobilità)	Pag.29
2.3.3 FATTORI PROGNOTICI ISTOPATOLOGICI	Pag.29
2.3.3.1 Tipo istologico	Pag.29
2.3.3.2 Elston Ellis Grade (1991)	Pag.30
2.3.3.3 Grado di Invasività Istologica (Gilbertson et al. 1983)	Pag.31
2.3.3.4 Grado di differenziazione nucleare	Pag.31
2.3.3.5 Evidenza di reattività cellulare linfoide viciniori alla neoplasia	Pag.32
2.3.3.6 Espressione di fattori angiogenetici (VEGF)	Pag.32
2.3.3.7 Frazione di crescita	Pag.34
2.3.3.8 Alterazioni molecolari	Pag.34
2.3.3.9 Espressione di recettori per estrogeni e progesterone	Pag.35

2.3.3.10 Espressione di recettori per COX-2	Pag.36
2.3.3.11 Espressione di HER2	Pag.37
2.3.3.12 Nuovi parametri	Pag.37
2.3.4 FATTORI PROGNOSTICI LEGATI AL COMPORTAMENTO METASTATICO	Pag.38
2.3.4.1 Metastasi linfonodali	Pag.43
2.3.4.2 Metastasi a distanza	Pag.45
2.3.5 FATTORI PROGNOSTICI LEGATI ALLO STADIO TNM	Pag.48
2.3.6 INFLENZA PROGNOSTICA DELL'APPROCCIO CHIRURGICO	Pag.51
2.3.6.1 Tecnica chirurgica	Pag.51
2.3.6.2 Complicazioni postchirurgiche	Pag.52
2.3.6.2 Metastasectomia	Pag.54
2.3.7 PROGnosi IN RELAZIONE ALL'INTERVENTO DI OVARIECTOMIA	Pag.54
2.3.7 INFLUENZA PROGNOSTICA DI RADIO E CHEMIOTERAPIA	Pag.57
CAPITOLO III: PARTE SPERIMENTALE	
3.1 MATERIALI E METODI	Pag.59
3.1.1 SCHEDE MAMMARIE	Pag.59
3.1.2 RICERCA METASTASI (STADIAZIONE TNM)	Pag.62
3.1.3 ESAMI DI LABORATORIO	Pag.63
3.1.4 CHIRURGIA	Pag.64
3.1.5 INDAGINE ISTOPATOLOGICA	Pag.64
3.1.6 FOLLOW UP	Pag.65
3.2 RISULTATI	Pag.66
3.3 DISCUSSIONE	Pag.81
CONCLUSIONI	
	Pag.86
BIBLIOGRAFIA	
	Pag.89
RINGRAZIAMENTI	
	Pag.95

KEY WORDS: bitch, mammary carcinoma, risk factors, prognostic factors

RIASSUNTO: The aim of the present study was to evaluate the role of different risk and prognostic factors of mammary carcinoma in bitches.

Bitches enrolled in the study were submitted to a two years follow up: relapse, new neoplasia, metastasis and death were taken into consideration. Different aspects were considered.

In our population mammary gland tumors occurred mostly in 9.4 (mean) year old bitches with a higher incidence between 10 and 11 years (range 4 to 15 years). The study showed an increased risk of mammary gland tumors only in Dalmatian and Yorkshire Terrier dogs but not in other breeds, different from other previous studies . A significant reduction in mammary neoplasia incidence was found in Labrador and Golden Retriever bitches. Both obesity and home-made diet may be an important risk factors. No significant correlation between diet tipology, body size and body condition score was found. Suburban environment seemed to play an important role in developing of mammary gland tumors. The topographic distribution of neoplasias was in agreement with previous studies showing a higher incidence of tumors in inguinal mammary glands (more than 60%).

A statistically significant correlation ($p<0.05$) was found between the reproductive phase cycle at the moment of the diagnosis of mammary tumors their localization.

Moreover bitches in cycling activity (proestrus, estrus and diestrus) showed a higher probability to develop inguinal mammary tumors. While the mammary tumors arisen during the cycling activity had only an inguinal localization, during anaestrus they developed in all mammary glands, showing a major incidence in caudal glands.

No statistically significant correlation was found between the anamnestic report of pseudopregnancy and the percentage of malignancy, pseudopregnancy and multiple tumors, and between pseudopregnancy and neoplastic localization.

Ovariectomy didn't influence significantly the relapse and the metastasis of mammary carcinoma and the surviving of bitches 6, 12 and 24 months after surgery. On the contrary, ovariectomy showed a significant influence ($p<0.05$) on the risk of developing new tumors after surgery.

TNM in the first two stages seemed to be inadequate for giving an accurate prognosis and assessing a therapeutic plan.

Histotype, histologic grading and histologic staging seemed to be adequate and accurate prognosis factors.

INTRODUZIONE

L'Oncologia nell'ambito della Medicina Veterinaria in Italia si è sviluppata come branca a sé stante soltanto negli ultimi anni. Seguendo le orme di quanto avviene in Medicina Umana si sta cercando di porre linee guida razionali ed univoche per l'approccio al paziente neoplastico.

Solo recentemente si è affermata l'importanza del concetto di "stadiazione" della malattia neoplastica al fine di pianificare un approccio terapeutico razionale. Inoltre la chirurgia che ha rappresentato fino a tempi molto recenti l'unico presidio terapeutico utilizzabile in ambito veterinario, viene oggi efficacemente affiancata nell'approccio al paziente neoplastico, da protocolli chemioterapici sempre più standardizzati ed efficaci. Inoltre oggi è possibile, anche in Italia, fare ricorso quando opportuno, a protocolli radioterapici.

Un grandissimo contributo allo sviluppo dell'Oncologia Veterinaria è derivato dal notevole miglioramento della tecnologia disponibile nella diagnostica per immagini che ha portato con sé un progressivo aumento della sensibilità nella ricerca delle metastasi a distanza.

In particolare le macchine ecografiche sono attualmente fornite di schermi ad alta definizione e le sonde sono dotate di tecnologia multifrequenza che consente di ottenere immagini migliori con una più netta distinzione dell'ecogenicità dei diversi organi e tessuti. In ambito radiologico la radiologia digitale, cioè la lettura dell'immagine da parte di un computer con la possibilità di adeguare il contrasto alle esigenze dell'operatore, ha permesso di poter discriminare lesioni molto piccole.

Nell'ambito della diagnostica per immagini si è anche assistito ad una notevole diffusione di apparecchiature per Tomografia Computerizzata (TC) che seppure ancora non sono utilizzate routinariamente per indagini di screening sono diventate comunque relativamente accessibili. Sono presenti sul territorio anche numerose apparecchiature per Risonanza Magnetica (RMN).

Tali procedure sono oggi affiancate dall'esecuzione di indagini cito-istopatologiche sulle lesioni sospette con conseguente aumento anche della specificità nell'identificazione delle lesioni primarie e dei processi metastatici.

Anche la diagnostica istopatologica, prendendo spunto da quanto accade in Medicina Umana, ha la possibilità oggi di eseguire indagini molto più approfondite rispetto al passato consentendo a sua volta un più preciso inquadramento della patologia neoplastica.

Oltre a tutte queste possibilità diagnostiche e terapeutiche la Medicina Veterinaria e la società italiana hanno assistito ad una aumentata sensibilità dei proprietari nei confronti dei loro animali domestici.

Tutti questi aspetti insieme hanno consentito il notevolissimo salto di qualità che l'Oncologia Veterinaria ha fatto negli ultimi anni.

Il carcinoma mammario della cagna occupa un posto di rilievo nell'ambito dell'Oncologia Veterinaria poiché la cagna è il mammifero con la più alta incidenza di neoplasie mammarie. Nei paesi come l'Italia, nei quali non viene eseguita routinariamente l'ovariectomia precoce, tale patologia rappresenta il 25% di tutti tumori del cane ed il 50% dei tumori totali della cagna.

Fino a non molto tempo fa in Italia non esisteva un'opinione unanime su quale fosse oggettivamente l'approccio più razionale per ottimizzare l'outcome di tale patologia. I vari approcci proposti spesso erano basati più su opinioni ed esperienze personali piuttosto che su evidenze scientifiche.

L'alta incidenza del carcinoma mammario della cagna giustifica il grande interesse che la ricerca scientifica veterinaria ha dimostrato nei confronti di tale patologia. Sono infatti molti gli studi clinici pubblicati che hanno preso in considerazione aspetti

epidemiologici, fattori di rischio e prognostici e di tale patologia nonché l'efficacia di taluni protocolli terapeutici.

Tali lavori hanno permesso di rendere certi alcuni fattori di rischio come ad esempio l'appartenenza a determinate razze, lo stato di nutrizione e il tipo di alimentazione. Si sono anche delineati con maggiore precisione quelli che sono i principali fattori prognostici clinici come la taglia del soggetto, le dimensioni della neoplasia ed il suo tempo di insorgenza, alcune caratteristiche macroscopiche come lo stato della cute sovrastante la neoplasia e lo stadio TNM. Allo stesso modo numerosi studi in ambito istopatologico hanno permesso di individuare le caratteristiche microscopiche con più alto potere predittivo. Il ricorso ad indagini immunoistochimiche per l'identificazione di recettori per determinate molecole ha consentito non solo una ulteriore raffinatezza nella emissione prognostica ma ha anche aperto la strada all'utilizzo razionale di taluni farmaci.

Nonostante i numerosissimi studi eseguiti sulle neoplasie mammarie della cagna sono ancora molteplici gli aspetti clinici di tale patologia ai quali non è stato attribuito un ruolo ed un significato soprattutto per quanto concerne i fattori di rischio e quelli prognostici. E' in quest'ambito che il presente studio si pone come obiettivo di dare un modesto contributo.

CAPITOLO I

ANATOMIA E FSIOLOGIA DELLA MAMMELLA DELLA CAGNA

1.1 EMBRIOGENESI, TOPOGRAFIA E STRUTTURA

Le mammelle si sviluppano a partire da due cordoni ectodermici che decorrono lungo la parete ventrale toraco-inguinale nel cane denominati *linee del latte*.

Alcune zone dei cordoni, specifiche per posizione e numero nelle diverse specie, presentano alcuni ispessimenti definiti come *creste del latte*; queste proliferano e si invaginano nel mesenchima sottostante dando origine ai *noduli mammari* e quindi alle *gemme mammarie* che si distendono nel precursore del pannicolo adiposo mammario e si ramificano a costituire un sistema di dotti.

In superficie l'ectoderma epidermico fornisce le strutture per la costituzione del capezzolo.

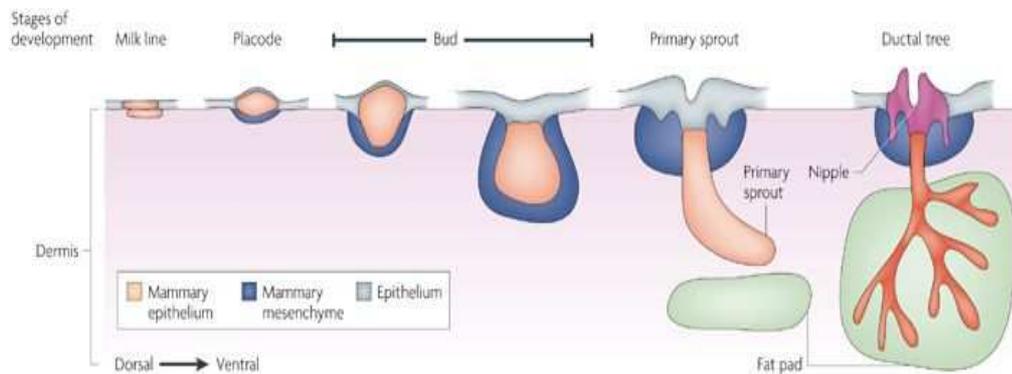


Fig. 1.1: Sviluppo della ghiandola mammaria

http://www.nature.com/nrg/journal/v8/n12/fig_tab/nrg2227_F1.htm, Dicembre, 2007

Lo sviluppo primario del tessuto ghiandolare mammario è probabilmente regolato da fattori di crescita locali e da geni regolatori dello sviluppo, anche se questa fase è reputata meno sensibile alla stimolazione ormonale.

Nella cagna si ritrovano normalmente cinque paia di mammelle che si distribuiscono in due file parallele paramediane dalla regione toracica a quella prepubica. In particolare abbiamo due paia di mammelle toraciche, due paia di mammelle addominali e un paio di mammelle inguinali.

Da un punto di vista strutturale la mammella è costituita dal corpo della mammella e dalla papilla o capezzolo. Il corpo della mammella si compone dalla pelle, da un rivestimento di tessuto connettivo elastico che costituisce l'apparato sospensore e dal parenchima ghiandolare che viene sorretto da un'impalcatura connettivale. Il capezzolo si trova sulla parte più rilevata della mammella come un prolungamento cilindroide.

Le mammelle di un lato sono sempre anatomicamente separate da quelle dell'altro lato da un setto mediano costituito dalla fusione degli apparecchi sospensori delle ghiandole controlaterali. Tra i due lati esiste indipendenza funzionale.

Il tegumento o pelle è aderente all'involucro fibroelastico e si presenta morbida e ricca di ghiandole sebacee. Nelle vicinanze della papilla si riscontrano ghiandole sebacee di volume ridotto annesse a follicoli di peli fini e corti.

L'apparato sospensore è formato da tessuto connettivo elastico che si continua esternamente con il derma della pelle ed internamente con l'impalcatura connettivale che sostiene il parenchima.

Tale apparato assume la forma di sacco che va ad avvolgere completamente la ghiandola se è unica, mentre se le ghiandole sono numerose negli intervalli tra le successive diventa indistinto.

Il corpo ghiandolare della mammella, accolto nella tela sottocutanea, è in rapporto dorsalmente con la fascia profonda del tronco o foglietto profondo della fascia esterna del tronco, che si interpone tra la base della mammella e la fascia dei muscoli sovrastanti dove costituisce la fascia mammaria profonda.

Quest'ultima ai lati di ogni corpo ghiandolare dà origine a due propaggini laminari che formano, portandosi verso il capezzolo, la fascia mammaria superficiale.

Il parenchima mammario è il costituente principale del corpo della mammella. È sostenuto da un'impalcatura connettivale che è in periferia e in continuità con l'apparato sospenditore della ghiandola ed internamente con il connettivo intralobulare, dividendo così il tessuto nobile in lobi e lobuli. Questo connettivo di sostegno è ricco di fibre collagene ed elastiche ed anche di tessuto adiposo che è presente soprattutto nella parte dorsale della ghiandola e nei periodi di inattività.

Il connettivo mammario rappresenta la componente prevalente alla pubertà mentre successivamente si riduce formando dei setti che durante i periodi di secrezione si assottigliano ulteriormente per la proliferazione degli alveoli. All'interno dei setti scorrono vasi e nervi.

Nel cane la mammella si definisce composta in quanto il corpo ghiandolare è composto da più ghiandole mammarie ognuna con un proprio sistema di dotti escretori ed ostio papillare.

Istologicamente sono ghiandole apocrine, tubuloalveolari composte.

L'alveolo ghiandolare è l'unità funzionale e secernente della ghiandola mammaria; ha la forma di un tubulo irregolarmente dilatato rivestito da un epitelio cubico semplice appoggiato su di una membrana basale con evaginazioni sacciformi o ramificazioni. Infine c'è uno strato discontinuo di cellule mioepiteliali o cellule a canestro o ancora mioepiteliociti stellati che, approfondendosi tra la membrana basale e l'epitelio ghiandolare, forma una rete la cui contrazione ne facilita la liberazione del contenuto.

I lattociti sono le cellule ghiandolari. A seconda del momento funzionale subiscono cambiamenti: se sono a riposo si presentano bassi, cuboidali e citoplasma scarso mentre durante la secrezione sono alte con citoplasma abbondante che fa protendere l'estremità apicale nel lume ghiandolare.

Da ogni alveolo mammario parte un condotto alveolare, con la medesima struttura e funzione, che poi si continua con il dotto intralobulare che invece presenta un epitelio basso senza attività secernente.

Si definisce lobulo l'insieme delle unità tubulo-alveolari che sboccano all'interno di un condotto intralobulare; i lobuli vengono drenati dai condotti interlobulari il cui epitelio assume un aspetto stratificato. Infine i condotti interlobulari confluiscono nei dotti lobari che a loro volta si raccolgono nel condotto lattifero o condotto galattoforo, che presenta un calibro grosso, irregolare, un epitelio bistratificato cubico e cellule muscolari abbondanti.

I condotti lattiferi arrivando alla base della papilla si dilatano nel seno lattifero che ha la funzione di serbatoio per il latte: qui lo strato di cellule muscolari lisce diventa più netto e quello fibroelastico più spesso. Ad ogni condotto corrisponde un proprio seno che può avere una parte ghiandolare ed una papillare che comunica con l'esterno tramite un condotto papillare.

La papilla della mammella è lo sbocco dei condotti terminali delle vie di escrezione del latte intorno ai quali nel derma si forma uno sviluppato plesso vascolare. Sulla sommità della papilla si ritrovano generalmente da 8 a 12 osti, più raramente da 4 a 22. Esistono osti periferici disposti alla periferia ed osti centrali di dimensioni maggiori e disposti irregolarmente. Da ogni ostio ha origine un condotto papillare il cui epitelio pavimentoso stratificato si continua qui nell'epidermide del rivestimento cutaneo.

Intorno ai condotti papillari c'è uno sfintere formato da cellule muscolari lisce in numero maggiore e con disposizione diversa rispetto a quelle che circondano i seni lattiferi, piccole cavità che si estendono nel terzo distale della papilla.

Le anomalie delle mammelle sono abbastanza frequenti nel cane.

Con i termini *polimastia* o *ipermastia* si indica la presenza di mammelle sovranumerarie che se si trovano in vicinanza di una mammella normale. Si tratta di mammelle accessorie ed è un evento abbastanza frequente nei cani di grossa taglia. Se invece mancano una o più mammelle si parla di *oligomastia* o *ipomastia*, evento questo più frequente nei soggetti di piccola taglia.

Se si riscontra la presenza di due papille per uno stesso corpo mammario si parla di *politelia* o *ipertelia*. Tale evento è abbastanza frequente. Al contrario l'assenza di una o più papille si definisce *oligotelia* o *ipotelia* ed è frequente del maschio mentre è una evenienza abbastanza rara nella femmina.

Anche la simmetria tra le due file può non essere rispettata con le mammelle che vanno ad assumere posizioni alternate.

Inoltre quando una o più mammelle sono di volume esagerato, in assenza di stati patologici o particolari momenti funzionali, si parla di *macromastia*. Viene invece definita *micromastia* invece è quando uno o più corpi mammari si presentano ipoplasici. Frequenti anche le anomalie a carico della papilla che può essere più grande (*macrotelia*) o più piccola (*microtelia*) rispetto alle dimensioni fisiologiche.

1.2 EVOLUZIONE E CONTROLLO ORMONALE

La conformazione delle mammelle nella cagna non è costante durante la vita dell'animale, ma cambia secondo lo stato funzionale in seguito a stimolazione ormonale.

Nella mammella sono presenti recettori per estrogeni, progesterone, fattore di crescita epidermico, prolattina, insulina, corticosteroidi. La mammella subisce pertanto un'influenza poliormonale molto complessa, anche se gli estrogeni sono gli ormoni più importanti.

Anche i recettori per il **progesterone** sono normalmente presenti nel tessuto mammario sano della cagna.

Le variazioni ormonali che si verificano durante il ciclo estrale determinano modificazioni a livello della ghiandola mammaria.

Il ciclo della cagna è suddiviso in quattro fasi: proestro, estro, diestro, anestro.

- **Proestro:** durata media 7 giorni (range 3-10) è caratterizzato da un aumento delle concentrazioni sieriche di estradiolo che provocano tumefazione vulvare, edema e corneificazione vaginale e sanguinamento uterino, che si manifesta all'esterno sotto forma di uno scolo vulvare siero ematico. La durata media è di 9 giorni (range 3-17).

I livelli plasmatici di estradiolo aumentano gradualmente dalle concentrazioni medie dell'anestro, inferiori a 15 pg/mL, a quelle di picco, superiori a 50 pg/mL, 1 o 2 giorni prima del picco dell'LH. In particolare gli estrogeni stimolano la crescita ghiandolare, soprattutto con un'azione a carico dei dotti galattofori. Tale stimolazione è più accentuata durante questa fase del ciclo estrale nella quale le concentrazioni ematiche di estradiolo sono più elevate.

Gli estrogeni hanno un effetto proliferativo sull'epitelio caratterizzato dall'aumento dell'indice mitotico.

Successivamente, queste concentrazioni declinano rapidamente durante il periodo di 1-2 giorni che precede il picco dell'LH e l'insorgenza dell'estro.

A livello mammario gli estrogeni stimolano la crescita ghiandolare, soprattutto con un'azione a carico dei dotti galattofori.

- **Estro:** la durata media è di 9 giorni (range 3-21). In coincidenza con il declino delle concentrazioni sieriche di estradiolo, le cellule del follicolo ovarico iniziano ad andare incontro a luteinizzazione e a secernere progesterone. I livelli sierici di questo ormone aumentano al di sopra di 1 ng/mL appena prima del picco dell'LH. Il declino dei livelli sierici di estrogeni e l'incremento delle concentrazioni sieriche di progesterone alla fine del proestro sono ritenuti responsabili dell'avvio del cambiamento comportamentale associato all'insorgenza dell'estro e dell'induzione del picco preovulatorio della secrezione di FSH e LH. L'innalzamento dei livelli dell'LH a sua volta avvia l'ovulazione e la conseguente formazione di corpi lutei.

Sulla mammella il progesterone ha un'azione trofica, soprattutto a carico della parte alveolare, complementare a quella degli estrogeni.

- **Diestro:** rappresenta la fase luteinica del ciclo. La secrezione luteinica del progesterone dipende dall'LH ipofisario e dalla prolattina. I livelli sierici di progesterone aumentano rapidamente durante le prime due settimane dopo il picco dell'LH e l'ovulazione e raggiungono la punta di 15-80 ng/mL entro 15-30 giorni dall'ovulazione. La concentrazione plasmatica di questo ormone resta elevata, ma declina gradualmente durante i due mesi successivi, indipendentemente dal fatto che la gravidanza si sia instaurata o meno. Il progesterone ha un'azione anabolizzante soprattutto a carico della parte alveolare, complementare a quella degli estrogeni. Durante la fase luteinica del ciclo estrale che può durare fino a 90 giorni, le componenti alveolari del tessuto mammario sono stimolate a lungo dal rilascio endogeno di questo ormone. Inoltre nel cane il progesterone ha un'emivita molto lunga, circa 10 volte maggiore rispetto alla durata che ha nella donna. Viene quindi eliminato lentamente rimanendo in circolo per un tempo superiore (Marcato e Sarli, 2002). Nelle cagne gravide si ha una rapida caduta preparto con il progesterone che si riduce a meno di 2 ng/mL. Ciò avviene circa 64 giorni dopo il picco dell'LH e circa 24 ore prima dell'inizio del parto. Questo declino può essere più graduale nelle cagne non gravide e può non arrivare ai livelli basali di 0,2-0,5 ng/mL per 90 giorni. Benché l'LH e la prolattina siano luteotropi, il corpo luteo del cane sembra non essere influenzato dalla gravidanza. Invece, la regressione luteinica pare avvenire dopo un periodo di durata predeterminata, indipendentemente o meno della disponibilità di LH.

A livello mammario si evidenzia un'ipertrofia, risultante dalle azioni di estrogeni e progesterone.

Endocrinologicamente questa fase termina quando le concentrazioni sieriche del progesterone diminuiscono a meno di 1 ng/mL.

La rapida caduta dei livelli plasmatici di progesterone (in seguito al parto o talvolta al termine del diestro con il fenomeno della pseudociesi) stimola la secrezione di prolattina che svolge azione trofica a livello degli alveoli mammari ed attiva la trascrizione genica per la sintesi delle proteine del latte. L'aumento dei livelli ematici di prolattina, solitamente osservato durante la seconda metà della gravidanza, favorisce lo sviluppo ulteriore del sistema acino-duttale della

ghiandola mammaria, in preparazione della imminente lattazione. Il progesterone inibisce la secrezione di prolattina attraverso un feedback negativo.

- **Anestro:** la durata è estremamente variabile, ma in media risulta di 4,5 mesi. Sono state identificate fluttuazioni pulsanti degli ormoni ipofisari LH ed FSH e della secrezione di estrogeni ovarici.

In questa fase la ghiandola mammaria regredisce.

Da un punto di vista strutturale microscopico fino alla pubertà la mammella conserva un aspetto simile a quello che si ritrova nella vita fetale: il tessuto connettivo è molto abbondante e i lobuli sono piccoli costituiti unicamente da condotti escretori.

Alla pubertà l'accrescimento della mammella è dovuto ancora al tessuto connettivo che si infila di grasso ma soprattutto ai lobuli che diventano più voluminosi. Questi ultimi risultano costituiti soprattutto da condotti il cui sviluppo arborizzato è regolato direttamente dagli ormoni estrogeni. Gli alveoli si formano più lentamente e rimangono solidi; il loro sviluppo avviene grazie all'azione combinata di estrogeni, progesterone, prolattina e ormone somatotropo. L'azione simultanea di questi ormoni e delle sostanze corticoidi prodotte dalla surrenale determina l'entrata in attività della mammella al termine della gravidanza.

A metà gravidanza molti alveoli si sono formati e poi cavitati. Al momento del parto la circolazione aumenta notevolmente, il tessuto connettivo intralobulare viene infiltrato da linfociti e plasmacellule, e l'epitelio ghiandolare da basso e inattivo diventa cubico e più alto.

Da un punto di vista macroscopico durante la lattazione invece (sia in seguito al parto sia alla fine della "pseudogravidanza") le mammelle aumentano di volume diventano coniche, leggermente appiattite lateralmente ed i corpi mammari entrano in contatto con quelli vicini, da cui sono distinti grazie a dei profondi solchi trasversali. Durante i periodi di inattività sono invece difficilmente isolabili l'una dall'altra.

A partire dalla quarta settimana di gravidanza le file mammarie di destra e di sinistra a loro volta prendono contatto tra loro, restando divise dal solco intermammario che si approfondisce.

Il volume delle mammelle non aumenta per tutte nello stesso modo: quelle pettorali hanno un incremento delle dimensioni minore rispetto a quelle inguinali, che, se a riposo si presentano abbozzate mentre durante la lattazione hanno lo sviluppo maggiore. Nelle femmine che non hanno mai avuto una lattazione le papille si ritrovano invaginate in una depressione cutanea e si presentano corte e ottuse. Successivamente si allungano e si arrotondano alle estremità, fino a raggiungere in lattazione una lunghezza di 10-12 mm o più a seconda della razza.

L'inizio dell'attività è caratterizzato dalla secrezione del colostro, liquido viscoso, giallastro, dotato di proprietà lassative e ricco di anticorpi. Dopo alcuni giorni il secreto assumerà tutte le caratteristiche proprie del latte.

Durante il periodo dell'allattamento gli alveoli sono larghi, con un lume ben visibile e completamente occupato dal latte, mentre i setti diventano molto più sottili. Un riflesso neuro-endocrino è preposto all'allontanamento del latte dalla ghiandola mammaria ed è costituito da un arco riflesso dove la componente afferente è data dagli stimoli nervosi mentre quella efferente dall'ormone ossitocina. La deformazione dei meccano-recettori capezzolari determinata dalla suzione provoca l'insorgenza di impulsi nervosi che vengono trasmessi attraverso i nervi mammari al midollo nel quale viaggiano nel tronco dorsale fino all'ipotalamo, ed in particolare a livello delle cellule neurosecretrici dei nuclei sopraottico e paraventricolare responsabili della sintesi dell'ossitocina. L'ormone si lega quindi ad una specifica proteina, la neurofisina I, e sotto forma di granuli si sposta alla porzione posteriore dell'ipofisi, sito di stoccaggio. Gli impulsi efferenti arrivano attraverso il peduncolo ipofisario alla parte

posteriore dell'ipofisi che immette in circolo l'ormone. In poco più di 20 secondi l'ormone perviene alla mammella dove, liberato dalla componente proteica, si lega a specifici recettori delle cellule mio epiteliali determinandone la contrazione. Il numero dei recettori cresce in prossimità del parto e raggiunge l'apice in piena lattazione. Questa contrazione, pur determinando un considerevole aumento della pressione endomammaria, non raggiunge un'intensità tale da superare la resistenza opposta dallo sfintere del dotto papillare capezzolare, resistenza che può essere vinta grazie all'aiuto della suzione.

La secrezione lattea è regolata dalla prolattina e dall'ormone somatotropo ipofisari mentre l'eiezione è determinata dall'ossitocina ipotalamica.

Per quanto riguarda la lattazione, la tiroide, pur essendo indispensabile, in sinergismo con altri ormoni, non sembra avere particolari compiti durante la fase di sviluppo e preparazione della ghiandola mammaria (funzione mastoplastica), ma sembra principalmente importante nella fase secretiva (funzione galattopoietica).

Alla fine del periodo di allattamento, a causa dell'interruzione dei riflessi neuromonali, la ghiandola regredisce: gli alveoli regrediscono e il tessuto connettivo ritorna ad essere la componente più rappresentata della ghiandola, che rimane nello stadio di riposo fino alla successiva gravidanza.

In vecchiaia la mammella entra in involuzione senile; gli alveoli scompaiono gradualmente e i condotti si riducono, mentre il tessuto connettivo, meno ricco di cellule e più o meno denso, costituisce nuovamente la quasi totalità della ghiandola.

Può capitare che alcuni residui ghiandolari invece di scomparire vadano incontro ad involuzione cistica.

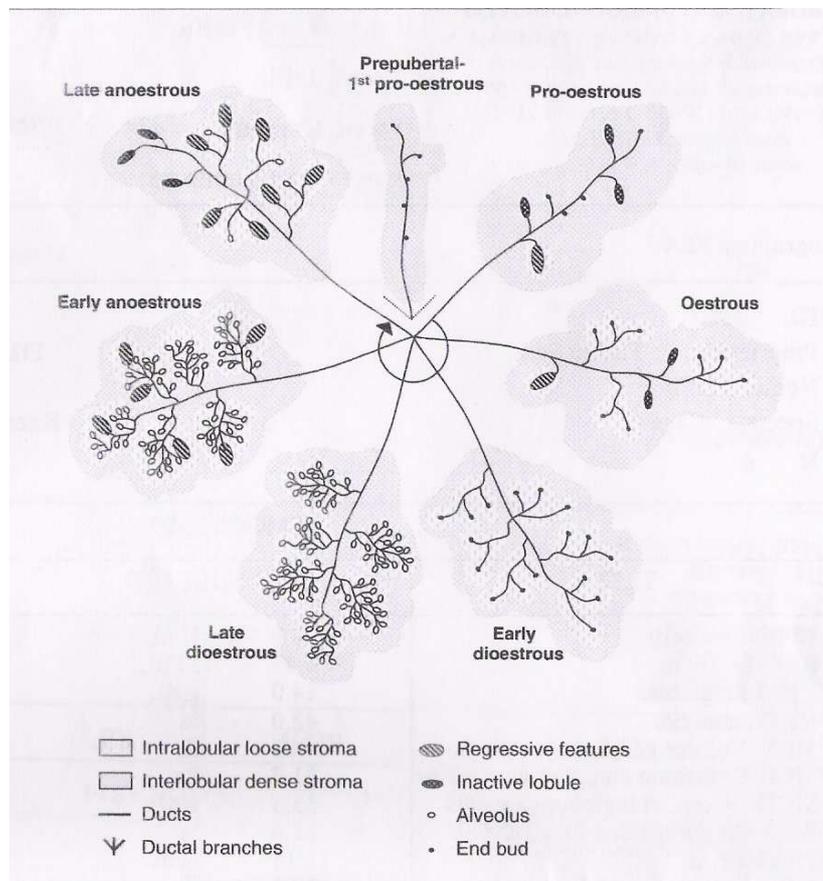


Fig 1.2 - Rappresentazione delle caratteristiche istologiche della ghiandola mammaria durante il ciclo estrale (da Santos et al., 2009)

- **Pseudociesi:** Si tratta di un evento parafisiologico su base ormonale che può interessare la cagna non gravida nel tardo diestro con lo stabilirsi di tutti o gran parte dei segni della gravidanza, compresi l'aumento di dimensioni dell'utero, l'aumento di volume della mammella e la secrezione latte. Si possono instaurare anche alterazioni comportamentali quali la preparazione del nido, l'eventuale adozione di cuccioli o di oggetti come surrogato dei figli. Tale sintomatologia è causata dal brusco declino dei livelli sierici di progesterone associato al termine della fase luteinica, che a sua volta provoca un incremento della concentrazione sierica di prolattina, proprio come avviene al momento del parto. Si può avere anche in seguito alla cessazione della somministrazione di progestinici esogeni e dopo un'ovariectomia eseguita durante il diestro. A livello delle cellule degli alveoli mammari la prolattina svolge azione trofica ed attiva la trascrizione genica per la sintesi delle proteine del latte.

1.3 IRRORAZIONE, INNERVAZIONE E DRENAGGIO LINFATICO

1.3.1 ARTERIE

Le mammelle toraciche ricevono il sangue cranialmente, da rami perforanti dell'arteria toracica interna che passano attraverso l'estremità ventrale degli spazi intercostali, medialmente dall'arteria epigastrica superficiale e, lateralmente, da rami mammari delle arterie intercostali e dall'arteria toracica laterale, ramo dell'arteria ascellare.

Le mammelle addominali e quelle inguinali sono irrorate dalle arterie epigastriche superficiali craniale e caudale che decorrono sulla loro faccia dorsale dove si anastomizzano. Le mammelle inguinali ricevono anche alcuni rami provenienti dall'origine dei rami labiali ventrali delle arterie pudende esterne.

Le dimensioni di questi vasi variano a seconda dello stato funzionale della ghiandola. Sono flessuosi, ramificati e anastomizzati tra loro da ciascun lato. Le loro ramificazioni si immergono nei setti della ghiandola e si suddividono con questi, si portano ai lobuli e si risolvono in una fittissima rete capillare disposta intorno agli alveoli e che accompagna i condotti lattiferi. Particolari rami sono destinati a ciascuna papilla, alla base della quale si anastomizzano; da qui origina una rete per i seni lattiferi e delle ramificazioni giungono fino all'estremità della papilla.

1.3.2 VENE

Sono satelliti delle arterie, ma più voluminose e più riccamente anastomizzate. Alla base della papilla si forma un vero e proprio cerchio venoso mentre un altro, più esteso ma meno regolare e spesso incompleto, si forma alla base della mammella. Le mammelle toraciche sono drenate dalle vene epigastriche superficiali craniali mentre le mammelle inguinali e addominali caudali dalla

vene epigastriche superficiali caudali e dalle pudende esterne. Le mammelle addominali craniali sono drenate da entrambi i sistemi.

1.3.3 VASI LINFATICI

Intorno alla base della papilla di ogni mammella si forma una rete capillare anulare a maglie fitte, che drena la papilla stessa ed il parenchima; si continua con una rete sottocutanea, dalla quale emergono, alla base del corpo mammario, 2-3 efferenti che si anastomizzano in parte con quelli delle ghiandole vicine e si portano ai linfonodi delle regioni corrispondenti.

Le mammelle toraciche sono drenate dai linfonodi ascellari, generalmente unici da ciascun lato, a volte duplici; sono situati 3-4 cm causalmente e centralmente all'articolazione della spalla, contro la terminazione del muscolo grande rotondo.

In alcuni casi si riscontra più causalmente un piccolo linfonodo ascellare accessorio. Eccezionalmente alcuni efferenti possono drenare direttamente nei linfonodi sternali.

I linfatici delle mammelle inguinali e di quelle addominali caudali vanno ai linfonodi mammari o inguinali superficiali che sono 1-2 da ogni lato e si trovano sulla faccia dorsale della mammella inguinale.

Le mammelle addominali craniali possono essere drenate da entrambi i gruppi di linfatici, spesso contemporaneamente.

1.3.4 NERVI

Sono forniti dai rami cutanei laterali e da quelli mediali dei nervi intercostali, dai rami superficiali dei primi tre nervi lombari (ileo-ipogastrico craniale, ileo ipogastrico caudale e ileo-inguinale) e dal ramo mammario del nervo genitofemorale.

Tutti questi nervi contengono principalmente fibre sensitive, cui si associano fibre simpatiche, vasomotorie, che provengono dai gangli corrispondenti della catena latero-vertebrale. Non è provata la partecipazione del sistema parasimpatico.

I fasci di fibre decorrono nei setti e si arco rizzano intorno agli alveoli.

L'attività delle cellule ghiandolari e di quelle mio-epiteliali è controllata soprattutto dagli ormoni.

A livello della papilla le fibre sensitive costituiscono dei plessi e fanno capo e numerosi corpuscoli tattili capsulati (corpuscoli di Meissner) e non capsulati (corpuscoli di Merkel), che svolgono un ruolo importante nell'attivazione del riflesso neurormonale e dell'attività ghiandolare durante la poppata.

CAPITOLO II

FATTORI DI RISCHIO E PROGNOSTICI DELLE NEOPLASIE MAMMARIE DELLA CAGNA

Generalmente il rilevamento di una o più neoformazioni mammarie avviene da parte del proprietario oppure da parte del veterinario nel corso di una routinaria visita di controllo.

Vista l'alta incidenza di questo tipo di problematica sarebbe buona norma da parte del veterinario curante educare i proprietari di cagne adulte, in particolare se intere e dopo i 6/7 anni di età, all'ispezione periodica delle mammelle del proprio cane. Tale atteggiamento è fondamentale al fine di ottenere una diagnosi precoce che, come in Medicina Umana, si è rivelata essere un fattore prognostico positivo estremamente importante.

Nel momento in cui il soggetto si presenta alla nostra attenzione sono molteplici i fattori da tenere in considerazione.

2.1 INCIDENZA

I tumori mammari rappresentano il 25% di tutti i tumori nel cane e sono le neoplasie più frequenti nella cagna rappresentando più del 50% di tutti i tumori (Marconato, 2005). Nel cane maschio si riscontrano con un'incidenza minore dell'1% e molti tra questi sono associati alla presenza concomitante di neoplasie testicolari germinali, in particolare Sertoliomi secernenti estrogeni.

Per quanto concerne la predisposizione di razza diversi studi riportano una maggiore incidenza di neoplasie mammarie in Toy, English Springer Spaniels, Brittany Spaniels, Cocker Spaniels, English Setters, Pointers, German Shepherds, Maltese e Yorkshire Terriers (Goldschmidt et al., 2001; Yamagami et al., 1996).

Le razze meno colpite sono Boxer e Chihuahua (Romanelli, 2007).

In un nostro studio eseguito nel 2009 nel quale abbiamo considerato 151 casi di cagne affette da neoplasia mammaria abbiamo effettivamente rilevato un aumento del rischio nelle razze riportate in letteratura ad eccezione dello Yorkshire Terrier.

Secondo un recente studio retrospettivo sembra che l'incidenza dei tumori maligni sia inferiore nelle razze di taglia piccola rispetto alle razze di grossa taglia (Itoh et al., 2005).

Il 65-70% delle neoplasie mammarie si riscontra nelle mammelle addominali caudali e inguinali, probabilmente a causa della maggior quantità di tessuto mammario (Withrow et al., 2007).

2.2 FATTORI DI RISCHIO

I fattori di rischio per l'insorgenza delle neoplasie mammarie sono stati ampiamente studiati sia in Medicina Umana che in Medicina Veterinaria perciò su tale argomento esiste una vastissima letteratura ed ormai è accertata la responsabilità di alcune circostanze.

2.2.1 ETA'

Nella cagna i tumori mammari sono patologie dell'età adulta: la loro incidenza aumenta notevolmente dopo i 6 anni di età (Egenvall et al., 2005) e l'età media di comparsa è tra i 10 e gli 11 anni, raramente prima dei 4 anni (Withrow et al., 2007).

2.2.2 ASSETTO ORMONALE ENDOGENO

Le neoplasie mammarie sono patologie ormono-dipendenti. È accertata l'influenza dell'attività ciclica infatti l'ovariectomia eseguita precocemente riduce significativamente l'insorgenza di tumori mammari.

La maggior parte dei soggetti colpiti è rappresentata da femmine intere oppure ovariectomizzate in età avanzata.

Diversi studi riportano dati riguardanti la riduzione del rischio in seguito ad ovariectomia precoce.

Schneider et al. (1969) riportano che il rischio di tumori mammari maligni in cagne ovariectomizzate entro il primo calore è ridotto allo 0,05%, dopo il primo calore è ridotto all'8% e aumenta fino al 26% se l'ovariectomia avviene dopo il secondo calore ma comunque entro il quarto. Dopo il quarto calore il rischio eguaglia quello dei soggetti interi.

Dati più recenti riportano una riduzione del rischio di tumori mammari dell'80% in caso di ovariectomia effettuata prima del primo calore, del 40% tra il primo e secondo calore, mentre oltre il secondo calore non vi sarebbe più riduzione della comparsa della neoplasia (Marconato e Del Piero, 2005).

Misdorp et al. (1991) hanno rilevato che ovariectomia effettuata più tardivamente non riduce il rischio di neoplasie mammarie maligne mentre hanno evidenziato una sua influenza sulla riduzione del rischio di insorgenza di neoplasie mammarie benigne.

Da uno studio condotto sullo stato recettoriale dei tumori mammari sembrerebbe risultare che la castrazione di una cagna dopo i due anni di età ma non nei due anni antecedenti all'insorgenza della neoplasia comporterebbe la selezione del sub clone ER- quindi meno differenziato e più aggressivo. Pertanto, secondo tali Autori, sarebbe meglio eseguire l'ovariectomia solo se compaiono tumori mammari o in caso di patologia dell'apparato genitale (Marconato e Del Piero, 2005). Tale studio è ad oggi l'unico sull'argomento e le conclusioni riportate non sono unanimemente accettate. In particolare non è chiaro se effettivamente l'ovariectomia non nei due anni precedenti alla mastectomia comporti una selezione positiva verso istotipi più aggressivi o se invece comporti una selezione negativa nei confronti di lesioni benigne o non neoplastiche.

Secondo gran parte degli autori l'ovariectomia eseguita in contemporanea alla mastectomia in soggetti adulti affetti da carcinoma mammario non apporta alcun beneficio in termini di sopravvivenza (Schneider et al., 1969; Morris et al., 1998; Yamagami et al., 1996; Gobello et al., 2001).

Un recente studio riporta invece un aumento della sopravvivenza in soggetti ovarioisterectomizzati nei 2 anni che precedono la comparsa della neoplasia o al momento della mastectomia, rispetto a cagne che rimangono intere o vengono sottoposte all'intervento prima dei 2 anni antecedenti l'insorgenza della neoplasia (Sorenmo et al., 2000).

2.2.3 SOMMINISTRAZIONE IATROGENA DI SOSTANZE ORMONALI

L'esposizione degli animali agli ormoni ovarici o ai loro derivati sintetici a dosi più alte rispetto ai livelli fisiologici, o per periodi prolungati, possono stimolare lo sviluppo di neoplasie mammarie (Withrow et al., 2007).

Gli estrogeni, che stimolano la crescita duttale, non aumentano di per sè l'incidenza di neoplasie mammarie. Una maggiore incidenza di neoplasie mammarie è stata invece osservata in cagne che hanno ricevuto alte dosi di estrogeni e progestinici in combinazione (Rutteman e Misdorp, 1993).

Al contrario, l'utilizzo protratto di progestinici per prevenire l'estro può favorire l'insorgenza di iperplasia mammaria, che evolve la maggior parte delle volte in una neoplasia mammaria benigna (Rutteman, 1992) che può a sua volta progredire verso un istotipo maligno..

È stata anche trovata una correlazione tra la somministrazione di progestinici long-acting per prevenire l'estro e la comparsa di neoplasie mammarie benigne nella cagna (Rutteman, 1990).

2.2.4 ANAMNESI DI PSEUDOCIESI

Il ruolo della pseudociesi sull'insorgenza delle neoplasie mammarie della cagna è un argomento ancora dibattuto ed i pareri dei vari Autori non sono ancora concordi.

La maggior parte degli studi non ha rilevato alcuna correlazione tra pseudociesi e neoplasie mammarie (Morris et al., 1998; Veronesi et al., 2003; Innocenti et al., 2010) mentre, secondo un recente studio, cagne con episodi pregressi di ripetute pseudociesi sono più suscettibili e manifestano la tendenza a sviluppare tumori mammari in tempi sensibilmente più precoci ma con meccanismi ancora da chiarire (Verstegen, 2006).

Va a nostro avviso sottolineato come l'assetto ormonale della cagna in pseudociesi sia sostanzialmente sovrapponibile a quello della cagna in gravidanza e come numerosi studi rilevino una non modificazione del rischio di insorgenza di neoplasie mammarie in cagne che abbiano portato avanti diverse gravidanze rispetto alle nullipare. In realtà alcuni Autori (Romanelli, 2007) sostengono effettivamente un maggior rischio nelle nullipare ma sono riportati dati di studi con elaborazione statistica dei risultati.

2.2.5 NUMERO DI GRAVIDANZE, ETA' DELLA PRIMA GRAVIDANZA, NUMERO DI CUCCIOLI

Nella donna è dimostrato come una gravidanza in giovane età comporti una riduzione del rischio di insorgenza di neoplasie mammarie (Helewa et al., 2002).

Tale osservazione non ha trovato conferma negli studi eseguiti sulla cagna.

L'età alla prima gravidanza così come il numero di parti, di cuccioli e di lattazioni non sembra influire sulla possibile insorgenza di neoplasie mammarie della cagna.

Secondo Romanelli le femmine nullipare sono esposte a maggior rischio di sviluppare neoplasia mammaria non supportando tuttavia questa affermazione con uno studio su ampia popolazione (Romanelli, 2007).

2.2.6 MUTAZIONE DI p53

Il gene oncosoppressore p53 è il gene più frequentemente mutato in corso di neoplasia nell'uomo. Molti studi hanno valutato questo gene nelle neoplasie mammarie della cagna e hanno riportato risultati variabili sia riguardo l'over expression sia la frequenza di mutazioni (Sorenmo et al., 2003). In uno studio il 17% delle neoplasie mammarie

esaminate ha mostrato una mutazione del gene p53 e studi statistici indicano che questa mutazione conferisce un aumento del rischio di recidive e morte (Wakui et al., 2001).

2.2.7 FATTORI DIETETICI E STATO DI NUTRIZIONE

E' ormai appurato come nella donna l'obesità giovanile rappresenti un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie mammarie (Stoll, 1998). Su tale base sono stati eseguiti alcuni studi anche in medicina veterinaria a proposito sia dell'effetto di diversi fattori dietetici che dell'obesità sul rischio di sviluppo di neoplasie mammarie nella cagna.

Shofer et al. nel 1989 e poi Withrow et al. nel 2007 hanno evidenziato come l'obesità ad un anno di età sia correlata ad un aumento del rischio di neoplasie mammarie nella cagna in accordo quindi con quanto riscontrato nella donna.

Inoltre secondo alcuni Autori la dieta casalinga sembra essere collegata ad un maggior rischio rispetto a quella commerciale (Pérez-Alenza et al., 1998; Shofer et al., 1989). Va però a nostro avviso sottolineato come una dieta casalinga sia tendenzialmente molto più ricca di grassi rispetto ad una dieta commerciale e quindi di per sé stessa predisponente all'obesità. In sostanza è ipotizzabile quindi che non siano i grassi di per sé un fattore di rischio ma l'obesità che alla loro assunzione consegue. Tali conclusioni sono confortate dal risultato di diversi studi eseguiti in Medicina Umana.

In particolare la leptina, ormone peptidico sintetizzato e secreto principalmente dagli adipociti, la cui produzione è strettamente correlata alla massa adiposa, è capace di aumentare la crescita di numerose linee cellulari tumorali (Bjørnbæk C. et al., 1997; Dieudonne M.N. et al., 2002). Esplica le sue funzioni biologiche attraverso l'interazione con uno specifico recettore di membrana (Ob-R).

La leptina svolge un importante ruolo sul normale sviluppo della ghiandola mammaria, nonché sul processo cancerogenico, enfatizzando la correlazione esistente tra obesità ed insorgenza del tumore mammario. E' stato ampiamente documentato che la leptina è in grado di stimolare la proliferazione di numerose linee cellulari tra cui quelle di carcinoma mammario umano, laddove l'ormone amplifica enormemente il segnale estrogenico che sostiene l'attività proliferativa cellulare (Wehling M., 1997; Catalano S. et al., 2003; Catalano S. et al., 2004).

Sulla base di tale fatti accertati in medicina umana, un recente studio eseguito in ambito veterinario ha valutato l'espressione della leptina (OB) e del suo recettore (ObR) nel tessuto mammario normale, iperplastico e neoplastico della cagna.

L'espressione della leptina è stata osservata negli adipociti normali e nelle cellule epiteliali mammarie normali. Gli Autori hanno inoltre riscontrato un'evidente espressione di OB e ObR nel tessuto iperplastico e nei tumori ben differenziati, mentre le cellule epiteliali dei carcinomi più aggressivi sembrano presentare una ridotta espressione di entrambi i marker (Ressel et al., 2008). Questi risultati sembrano in contrasto con i precedenti studi eseguiti in Medicina umana e necessitano di ulteriori approfondimenti.

L'obesità e una dieta ricca di grassi sono state associate anche ad un aumento del rischio di tumore al seno nella donna anche in età postmenopausale.

Ciò è potenzialmente imputabile a diversi fattori quali l'iperinsulinemia, aumentati livelli di IGF-1 e diminuiti livelli sierici di sex hormone-binding globulin (SHBG) con conseguente aumento dei livelli sierici di estrogeni e quindi un aumento del rischio di tumore al seno (La Guardia e Giammanco, 2001; Stoll, 2000).

Inoltre numerosi studi epidemiologici hanno mostrato un aumento del rischio di cancro al seno tra le donne che hanno una riduzione dei livelli di SHBG e quindi elevati livelli di androgeni ed estrogeni biodisponibili. Questo profilo endocrino è generalmente

associato ad obesità e iperinsulinemia cronica, di cui è più probabilmente un risultato. La mancanza di attività fisica, l'obesità e una dieta ricca di carboidrati rapidamente digeribili e poveri in fibra favoriscono lo sviluppo di insulino-resistenza e iperinsulinemia. I livelli di insulina a loro volta sono legati alla diminuzione nel plasma e nei tessuti di IGFBP-1 e IGFBP-2 e questo può aumentare la disponibilità di IGF-I. Come l'insulina, IGF-I inibisce anche la sintesi epatica di SHBG.

È quindi ipotizzato che il rischio di cancro al seno può essere maggiore in donne con elevati livelli plasmatici di insulina, e/o con elevati livelli di IGF-I. L'iperinsulinemia potrebbe quindi essere un importante legame fisiologico tra uno stile di vita occidentale, ipernutrizione, e un aumento del rischio di cancro al seno (Kaaks, 2001).

Donne che si alimentano con una dieta povera di grassi hanno livelli sierici di estrogeni significativamente più bassi e un minor rischio di tumore al seno rispetto a donne che utilizzano una dieta ricca di grassi (Hankinson et al., 1998).

Shofer et al. sempre nello studio pubblicato nel 1989 ha anche osservato che una alimentazione del cane con diete a base di carne rossa cruda, soprattutto manzo e maiale, è associata in modo significativo alla cancerogenesi mammaria. Sempre lo stesso Autore ha inoltre osservato che una dieta post-mastectomia povera di grassi (< 39%) e ricca di proteine (>27%) ha una influenza positiva in termini di sopravvivenza.

Dal punto di vista clinico può essere utile sapere che le cellule tumorali hanno difficoltà ad utilizzare i lipidi e pertanto questi possono continuare a costituire una fonte energetica utile per l'ospite.

Sulla base dei risultati di tali studi in Medicina Umana viene attribuita molta importanza alla formulazione della dieta del paziente oncologico inserendo integrazioni contenenti acidi grassi polinsaturi omega-3 che comporterebbero un miglioramento delle condizioni generali legato appunto alla diminuzione delle alterazioni metaboliche e quindi delle conseguenze dei processi infiammatori indotti dal tumore stesso ed in ultima istanza al rallentamento dei fenomeni metastatici e della crescita della massa primaria.

E' stato dimostrato come un apporto adeguato di omega-3 possa ridurre le alterazioni metaboliche che caratterizzano la cachessia, la crescita neoplastica e la metastatizzazione ed anche migliorare la risposta alla chemio-radioterapia.

Anche in Medicina Veterinaria è stata evidenziata l'importanza dell'integrazione nella dieta degli omega 3 in cani affetti da neoplasie (Ogilvie ,1995; 1999) evidenziando come questi influiscano negativamente sulla crescita tumorale. Risulta anche che l'integrazione con omega 3 insieme all'arginina e i nucleotidi migliori la funzione immunitaria, riduca il danno da radiazione della cute, prolunghi il periodo di remissione ed anche il tempo di sopravvivenza (Ogilvie e Moore, 1995; Ogilvie, 1999).

Gli omega-3 sarebbero quindi indicati come trattamento adiuvante nella terapia delle neoplasie mammarie ed epiteliali in generale.

I risultati riportati, seppur promettenti, sono il frutto di un numero limitato di studi in medicina umana e saranno quindi necessari ulteriori studi per confermare i risultati ottenuti.

2.3 FATTORI PROGNOSTICI

La prognosi è un giudizio di previsione sul probabile andamento della malattia emesso sulla base di quanto riportato in letteratura. Si tratta generalmente di valori medi e come tali devono essere chiaramente presentati. E' evidente come il continuo incremento del

numero di pubblicazioni in oncologia veterinaria permetta di attingere a popolazioni sempre più ampie e quindi statistiche più attendibili. Il progresso delle opportunità diagnostiche e l'integrazione di vari aspetti della patologia ha permesso di migliorare in maniera notevole il valore predittivo delle emissioni prognostiche.

Si tratta comunque di valori medi che il medico dovrà adattare e rivalutare in relazione al singolo caso integrando tutte caratteristiche che lo contraddistinguono.

La prognosi può essere emessa nei confronti di diversi aspetti della salute e della vita futura del soggetto:

- ❖ **PROGNOSI QUOD VITAM:** previsione riguardo la probabile durata della vita residua del soggetto
- ❖ **PROGNOSI QUOD FUNCTIONEM:** previsione riguardo alla funzionalità di un singolo organo o apparato senza influenza significativa senza colpire o deteriorare in maniera grave la funzionalità dell'organismo nel suo complesso.

In uno stesso paziente la prognosi può cambiare nel tempo in base all'evoluzione della malattia rivalutata nelle varie tappe di follow up.

Per quanto concerne le neoplasie mammarie della cagna sono molteplici gli aspetti ai quali è stato attribuito un significato prognostico ben preciso ma ve ne sono altri il cui significato è ad oggi oggetto di discussione.

Withrow 2007 riporta la seguente tabella:

<i>BUONA</i>	<i>CATTIVA</i>	<i>INDIFFERENTE</i>
Diametro < 3 cm	Diametro > 3cm	Età
Ben circoscritto	Invasivo, ulcerato	Razza
Linfonodo negativo	Linfonodo positivo	Intera vs Castrata
ER+/PR+	ER+	Peso
Sottotipo istologico carcinoma ben differenziato, complesso, tubulare/papillare	sottotipo istologico: carcinoma scarsamente differenziato, semplice, solido, anaplastico; carcinoma infiammatorio; sarcoma	Tipo di chirurgia
Tumore grado I	Tumore grado III	Numero di tumori
Indice di proliferazione basso	Indice di proliferazione alto	Sede topografica

2.3.1 FATTORI LEGATI ALL'OSPITE

2.3.1.1. Razza e taglia

Mentre in letteratura esistono numerosi studi che riportano una maggiore incidenza di neoplasie mammarie in alcune razze i dati riguardanti l'influenza della razza sulla prognosi sono pochi e spesso discordanti.

Secondo alcuni Autori razza e stato di nutrizione non sembrano influenzare la sopravvivenza in cani con tumori maligni (Philibert et al. 2003), mentre secondo altri il tumore mammario nel Pastore Tedesco sembra avere una prognosi peggiore (Romanelli, 2007; Dobson et al., 2003).

Recentemente Itoh e collaboratori hanno eseguito uno studio su cagne affette da neoplasie mammarie, benigne e maligne, analizzando le eventuali differenze tra le razze di taglia piccola e quelle di taglia media e grande. Nelle razze di taglia piccola il 25% delle neoplasie erano maligne e solo il 6,7% dei soggetti è deceduto a causa della neoplasia, mentre nelle taglie più grandi è stata diagnosticata una neoplasia maligna nel 58,5% dei casi e il 26,8% dei soggetti sono deceduti a causa del tumore. Inoltre gli Autori hanno evidenziato una predominanza di carcinoma *in situ* (grado 0) nelle razze

di taglia piccola, al contrario delle altre dove predominano i carcinomi invasivi (grado I e II). Spesso i cani di taglia piccola hanno un maggior contatto con i proprietari che riescono a rilevare i noduli anche di piccole dimensioni: infatti il 77,6% aveva neoplasie di diametro inferiore ai 3 cm, mentre tra i cani di taglia grande solo il 50% delle neoplasie era di piccole dimensioni (Itoh et al., 2005). In questo caso la maggiore sopravvivenza riscontrata nei cani di taglia piccola può essere imputabile in parte alla presenza di un'elevata percentuale di neoplasie benigne oltre che ad un maggior riscontro di carcinomi *in situ* e alla predominanza di neoplasie di diametro inferiore ai 3 cm, tutti fattori prognostici positivi. In buona sostanza i cani di taglia piccola beneficiano tendenzialmente di una diagnosi più precoce quindi con un tempo di insorgenza inferiore, maggiori probabilità di benignità (correlata alle dimensioni) e dimensioni tendenzialmente minori.

Per valutare l'effettiva differenza in termini di sopravvivenza tra le razze di taglia piccola e le altre andrebbero inclusi nella popolazione solo soggetti affetti da carcinoma, con particolare riguardo alla stadiazione istologica per evitare di avere discrepanze tra i due gruppi in grado di influenzare la prognosi.

2.3.1.2 Sesso

I tumori mammari sono le neoplasie più comuni nella femmina rappresentando il 41,7% di tutti i tumori nei soggetti non ovariectomizzati in età precoce mentre, come già specificato nel capitolo precedente, il carcinoma mammario nel maschio è estremamente raro e generalmente conseguenza di patologie testicolari secernenti estrogeni (sertoliomi). Uno studio retrospettivo del 2007 effettuato su 8 cani maschi affetti da neoplasia mammaria ha evidenziato una percentuale di tumori benigni pari all'87,5% (Saba et al., 2007). Nel caso invece che ci si trovi di fronte all'insorgenza di un carcinoma mammario in un maschio in assenza di concomitanti neoplasie testicolari la prognosi è da considerarsi sempre estremamente riservata a causa delle spiccate caratteristiche di malignità che generalmente presenta.

2.3.1.3 Età

Riguardo l'importanza prognostica dell'età al momento della diagnosi non esiste un'opinione unanime.

Diversi studi riportano l'età avanzata alla diagnosi come un fattore prognostico negativo (Schneider et al., 1969; Hellemen et al., 1993). L'età non è solitamente associata ad un istotipo più maligno e non può essere considerato un fattore prognostico negativo in sé stesso. Piuttosto, l'età avanzata alla diagnosi e la preoccupazione in merito alla tossicità dei farmaci possono influenzare la scelta della terapia adiuvante somministrata ai pazienti anziani ottenendo trattamenti meno efficaci (Sorenmo, 2003). Inoltre bisogna tener presente che l'espressione dei recettori ER diminuisce significativamente con l'età della cagna al momento della diagnosi e l'assenza, o comunque la minore espressione, di tali recettori è associata ad un istotipo tumorale tendenzialmente più maligno. Infatti alcuni Autori hanno evidenziato che bassi livelli di ER nel tumore mammario primitivo si associano alla presenza di metastasi nel follow-up (Nieto et al., 2000).

In uno studio del 2003, Philibert e collaboratori non hanno trovato una correlazione significativa tra l'età del soggetto al momento della diagnosi e la sopravvivenza (Philibert et al., 2003). Romanelli riporta invece una prognosi peggiore in caso di neoplasie insorte in animali giovani, senza però supportare tale affermazione con dati scientifici (Romanelli, 2007). Un'ipotesi a riguardo potrebbe essere la seguente: nel soggetto giovane il sistema immunitario è generalmente molto più competente rispetto al soggetto anziano ed anche i processi riparativi di errori nella replicazione cellulare sono decisamente più efficienti. È quindi probabile che una neoplasia che riesce ad

insorgere nel soggetto giovane, nonostante l'efficienza dei suoi meccanismi difensivi e riparativi, sia di per sé molto aggressiva. Questa ipotesi è suffragata da numerosi studi in umana: le patologie oncologiche nei pazienti pediatrici sono decisamente molto più aggressive (mediamente) di quelle che insorgono nei pazienti geriatrici che per incompetenza immunologica ed inefficienza nella riparazione cellulare sono colpiti da patologie di per sé anche non particolarmente aggressive.

2.3.1.4 Altrazioni ematologiche

Ad oggi, sia in Medicina Umana che in Medicina Veterinaria, non siamo a conoscenza di markers tumorali specifici che si alterino in corso di neoplasie mammarie. In linea generale possiamo dire che è di riscontro abbastanza comune il rilevamento di un aumento della fosfatasi alcalina (ALP) sulla cui origine esistono ancora diverse ipotesi. Tale incremento potrebbe essere secondario alla produzione di un isoenzima da parte delle cellule mio-epiteliali, all'induzione dell'isoenzima corticosteroidi-indotto evocato dallo stress cronico o anche all'attività delle cellule neoplastiche che vanno incontro a metastasi ossea (evento quest'ultimo molto raro nella cagna ma estremamente frequente nella donna affetta da carcinoma mammario).

La fosfatasi alcalina è in generale un indice di proliferazione cellulare per cui se un tumore di qualsiasi natura si accresce rapidamente si assiste ad un suo aumento e tale eventualità è quindi da considerarsi un fattore prognostico negativo. Nella donna in corso di processi metastatici si assiste generalmente anche ad un aumento della calcemia.

Considerando comunque che generalmente si tratta di pazienti geriatrici si procede all'esecuzione di un profilo biochimico epato-renale il più completo possibile al quale si associa un esame emocromocitometrico, un profilo elettrolitico ed un profilo coagulativo. E' evidente come alterazioni delle condizioni generali del soggetto, seppur indipendenti dalla patologia neoplastica in sé, possano rappresentare un fattore prognostico negativo andando ad influenzare le scelte relative ad eventuali terapie adiuvanti

2.3.2 FATTORI PROGNOSTICI CLINICI LEGATI ALLA NEOPLASIA

2.3.2.1 Localizzazione del tumore

Nei diversi studi eseguiti a riguardo non è stata trovata alcuna correlazione tra localizzazione del nodulo e prognosi.

2.3.2.2 Nodulo singolo vs noduli multipli

Non sembra essere un fattore prognostico. Tumori multipli non implicano necessariamente una prognosi peggiore (Sorenmo, 2003).

Ogni nodulo è un'entità patologica a sé stante quindi in caso di noduli multipli possono essere presenti diversi istotipi. Per questo motivo è molto importante segnalarli ed analizzarli tutti. La molteplicità può influenzare la prognosi poiché può eventualmente imporre un intervento più invasivo ed una anestesia di durata maggiore in pazienti che spesso hanno patologie geriatriche concomitanti.

2.3.2.3 Dimensioni della neoplasia

La dimensione tumorale è una delle variabili prognostiche più importanti. Infatti, è la prima variabile presa in esame dalla stadiazione clinica TNM che, oltre alle dimensioni

del tumore (T), considera anche l'interessamento linfonodale (N) e la presenza di metastasi a distanza (M).

Tumori di diametro inferiore a 3 cm sono associati ad una prognosi migliore rispetto a quelli di diametro uguale o maggiore a 3 cm (Sorenmo, 2003).



*Fig. 2.1- Neoformazioni mammarie di notevoli dimensioni
Dipartimento di Clinica Veterinaria - Università degli Studi di Pisa*

Informazioni sulla dimensione del tumore sono facilmente disponibili, non richiedono ulteriori test diagnostici e forniscono importanti informazioni prognostiche da considerare al momento di decidere la necessità o meno di eventuali terapie aggiuntive. Philibert e collaboratori hanno rilevato un incremento del tempo di sopravvivenza (22 mesi vs 14 mesi) nei soggetti con tumori di diametro <3 cm rispetto a quelli con tumori di diametro maggiore (Philibert et al., 2003).

DIAMETRO NODULO (cm)	SOPRAVVIVENZA POST- CHIRURGICA (mesi)	RECIDIVA (%)
<2	36	<20
>2<3	24	>20<70
>3	6-12	>70

Tab. 2.1 - Tempo di sopravvivenza post-chirurgica e frequenza di recidive in relazione alla dimensione del tumore primario (Fossum, 2007; Marconato e Del Piero, 2005)

Le dimensioni del tumore sono rilevanti ai fini prognostici finché siamo in presenza di una malattia d'organo.

Con l'invasione dei vasi linfatici e la comparsa di metastasi a distanza si ha il passaggio a malattia sistemica e tali dimensioni perdono parte della loro importanza. Nella stadiazione clinica TNM la presenza di malattia sistemica è identificata con gli stadi IV e V, che infatti comprendono tumori di qualsiasi dimensione.

A conferma di quanto detto finora, uno studio condotto su un gruppo di cani con invasione dei vasi linfatici o metastasi linfonodali, non ha rilevato differenze tra tumori T1, T2 e T3 (Kurzman e Gilbertson, 1986). Le dimensioni del tumore sono spesso correlate al tempo di insorgenza: con il passare del tempo le dimensioni tendono ad aumentare e a causa della progressione neoplastica, si può avere la trasformazione di una cellula tumorale benigna in una aggressiva e potenzialmente metastatica. Secondo il modello di "evoluzione clonale" descritto da Nowell (1976), le neoplasie progrediscono sulla base di una labilità o instabilità genetica della loro popolazione cellulare, che dà luogo all'emersione sequenziale di sottopopolazioni mutanti (derivate dal clone originario e spesso riconoscibili citogeneticamente), le quali manifestano un crescente potenziale di malignità (cosiddetta "progressione"). L'evoluzione clinica del tumore è perciò il risultato finale di una continua selezione di sottopopolazioni cellulari

neoplastiche che si modificano in modo crescente. Per questo motivo i tumori di maggiori dimensioni hanno tendenzialmente un istotipo più maligno.

Bisogna però tenere presente che non sempre le dimensioni tumorali sono direttamente proporzionali al tempo di insorgenza perché un'altra variabile da considerare è la velocità di crescita.

In ogni caso ci pare opportuno sottolineare come l'aumentata sensibilità dei proprietari nei confronti della salute dei loro cani rende sempre più raro il riscontro di neoplasie di dimensioni maggiori di 5 centimetri. Per tale ragione, ed in virtù dei notevolissimi progressi ottenuti dall'oncologia veterinaria negli ultimi anni, sarebbe a nostro avviso opportuno ridurre limiti dimensionali dei primi tre stadi TNM per adeguarli allo stato attuale della medicina veterinaria.

2.3.2.4 Tempo di insorgenza della neoplasia

Tutta la letteratura è concorde nell'individuare nel tempo di insorgenza un importante fattore prognostico.

Tumori maligni presenti da più di 6 mesi hanno una prognosi peggiore di quelli presenti da meno di 6 mesi (Romanelli, 2007).

L'importanza del fattore tempo può essere correlata a diversi aspetti. Innanzi tutto vanno considerate le dimensioni del tumore: con il passare del tempo la neoplasia tende più o meno velocemente ad aumentare di dimensioni. Le dimensioni sono un fattore prognostico molto importante infatti è stato dimostrato che tumori mammari di diametro inferiore a 3 cm hanno prognosi migliore rispetto a quelli più grandi (Sorenmo, 2003). Inoltre sono correlate anche con l'istotipo infatti un tumore di dimensioni maggiori ha tendenzialmente un istotipo più maligno (progressione neoplastica). Tali concetti rimandano alle considerazioni fatte nel presente paragrafo riguardo alla taglia dove si sottolinea l'importanza della diagnosi precoce.

Il concetto di "progressione neoplastica" consiste nel fatto che, in alcuni casi, i tumori benigni possono subire con l'andar del tempo una trasformazione, talvolta improvvisa, talvolta graduale, delle loro caratteristiche biologiche, assumendo un'evoluzione maligna. Con il tempo si verifica un accumulo di alterazioni a livello genico che favoriscono l'evoluzione fenotipica e la trasformazione di una cellula tumorale benigna in una aggressiva potenzialmente metastatica. I risultati scientifici degli ultimi 10 anni hanno evidenziato che la trasformazione di una cellula normale in maligna richiede solo poche alterazioni molecolari, biochimiche e cellulari acquisite, che sono comuni a tutti i tipi di neoplasia.

La conversione di cellule epiteliali normali verso un fenotipo maligno è associato a cambiamenti nell'espressione e nella funzione dei sistemi di reciproca adesione tra cellule le quali assumono caratteristiche migratorie che conferiscono al tumore la capacità di invadere i tessuti e di dare metastasi.

Queste ultime caratteristiche sono spesso il risultato di un'acquisizione sequenziale di una maggiore motilità che le rende in grado di prevaricare l'interazione cellula-cellula o cellula-matrice e di invadere i tessuti circostanti.

Le alterazioni acquisite che dettano la trasformazione e la crescita maligna sono:

1. Capacità delle cellule neoplastiche di crescere in maniera autonoma
2. Insensibilità ai fattori che bloccano la replicazione cellulare
3. Evasione ai meccanismi apoptotici
4. Potenziale replicativo illimitato
5. Angiogenesi
6. Capacità di invadere i tessuti e metastatizzare

L'importanza di una diagnosi precoce ha spinto il Medico Veterinario a cercare sempre una maggior collaborazione da parte del proprietario in modo da poter tenere

costantemente sotto controllo l'animale e rilevare anche la più piccola alterazione. La variabilità morfologica tra le razze presenti rende l'identificazione dei noduli di piccole dimensioni non sempre molto agevole. Infatti se per il proprietario di un cane di piccola taglia a pelo corto è abbastanza semplice accorgersi anche di una piccola neoformazione, anche per le maggiori manipolazioni a cui generalmente sono sottoposti i cani di taglia piccola, lo stesso non può dirsi per il proprietario di un cane di taglia media o grande, soprattutto se a pelo lungo, dove il nodulo può essere rilevato visivamente solo quando di dimensioni più elevate. È necessario sensibilizzare i proprietari all'importanza di una palpazione mammaria accurata, da eseguire periodicamente al fine di rilevare precocemente qualsiasi neoformazione. Gli interventi terapeutici hanno la massima probabilità di essere utili e risolutivi quando la dimensione tumorale è ridotta. Il rilevamento di un nodulo di piccole dimensioni permette di sottoporre il paziente ad un intervento chirurgico meno invasivo (migliorando ulteriormente la prognosi soprattutto nei soggetti anziani), inoltre spesso è associato ad un'istotipo tendenzialmente più benigno, con minor probabilità di invasione linfatica e metastasi a distanza. Il tutto predispone ad una prognosi migliore.

2.3.2.5 Velocità di crescita della neoplasia

Una velocità di crescita elevata è associata a maggiore aggressività della neoplasia. Infatti la velocità di crescita è direttamente proporzionale al grado di indifferenziazione. Poiché la rapidità di sviluppo condiziona la malignità del tumore, i tumori omoiotipici (che conservano le caratteristiche del tessuto originario), differenziati, a crescita lenta, sono di regola benigni, mentre i tumori eterotipici, indifferenziati, a crescita rapida, sono di solito maligni.

Il comportamento biologico del tumore è influenzato dalla capacità della neoplasia di indurre la crescita e l'organizzazione endoteliale. Senza un adeguato supporto sanguigno infatti il tumore non cresce oltre 1-3 mm ed il suo tasso metastatico è basso o assente. Questo stadio è definito come fase prevascolare o, per i tumori epiteliali, come carcinoma *in situ*. Al contrario, una neoplasia aggressiva con un potenziale metastatico elevato sopprime i fattori antiangiogenetici e favorisce la produzione locale e propria di fattori angiogenetici, che a loro volta stimolano lo sviluppo di una vascolarizzazione che nutre esclusivamente il tumore. Grazie ai vasi neoformati, il tumore può crescere esponenzialmente in un intervallo molto breve. Si pensa che l'evoluzione maligna di un tumore dipenda proprio dal reclutamento di nuovi vasi dalla vascolarizzazione preesistente. Una rete vascolare funzionale, infatti, oltre a provvedere in senso metabolico, facilita la diffusione metastatica delle cellule neoplastiche.

La velocità di crescita dipende molto dall'indice mitotico che viene valutato istologicamente e indica il numero di mitosi per campo osservato a 400x. E' uno dei marker utilizzati per valutare la proliferazione cellulare di un tumore, insieme a AgNOR (regioni nucleolari organizzate argentate) ed agli antigeni associati alla proliferazione (PCNA, Ki-67, rilevabili con tecniche di immunoistochimica). Diversi studi dimostrano come tali marker consentano di predire il comportamento biologico della neoplasia (recidiva, risposta alla chemioterapia e tasso metastatico) (Peña et al., 1998; Sarli et al., 2002; Zuccari et al., 2004; Bundgaard-Andersen et al, 2008). In genere, tanto più sono elevati i marker tanto più velocemente si dividono le cellule e tanto più aggressivo è il tumore.

2.3.2.6 Stato della cute sovrastante la neoplasia

L'ulcerazione cutanea ed aree di necrosi della massa neoplastica si accompagnano ad una maggiore malignità e ad una prognosi peggiore.

Il sistema vascolare che supporta una massa tumorale è meno efficiente di quello di un tessuto normale. Più indifferenziato è il tumore meno la vascolarizzazione risponde alle esigenze di supporto dei tessuti e si ha quindi un ambiente povero di ossigeno e con pH acido. Questa situazione rallenta la crescita del tumore e induce fenomeni necrotici.

La comparsa di aree necrotiche è associata alla scarsa differenziazione del tumore, a sua volta legata ad una prognosi peggiore.

La cute infiammata e il coinvolgimento di diverse mammelle possono far sospettare la presenza di un carcinoma infiammatorio, con prognosi infausta.

2.3.2.7 Adesione ai piani sottostanti (mobilità)

È un fattore prognostico negativo in quanto l'adesione alla fascia sottostante è indice di una maggior invasività tumorale.

Il tumore maligno non rimane incapsulato perché l'accrescimento è rapido, talvolta tumultuoso, e ha carattere infiltrativo e distruttivo.

In questo caso durante la chirurgia applichiamo margini più ampi sul piano profondo evitando di tentare di scollare la fascia mammaria da quella muscolare sottostante ma asportando anche quest'ultima con margini più ampi possibile.

2.3.3 FATTORI PROGNOSTICI ISTOPATOLOGICI

2.3.3.1 Tipo istologico

La World Health Organization (WHO) ha proposto una classificazione dei tumori mammari sulla base dell'istotipo, modificata poi nel 1999 da Misdorp W., Else R., Hellman E. et al.

Schematicamente:

1 FORMAZIONI NEOPLASTICHE MALIGNI

1.1. Carcinoma non infiltrante (in situ)

1.2. Carcinoma complesso

1.3. Carcinoma semplice

1.3.1 carcinoma tubulopapillare

1.3.2 carcinoma solido

1.3.3 carcinoma anaplastico

1.4. Tipi speciali di carcinoma

1.4.1 carcinoma a cellule fusate

1.4.2 carcinoma squamoso

1.4.3 carcinoma mucinoso

1.4.4 carcinoma lipid-rich

1.5. Sarcoma

1.5.1 fibrosarcoma

1.5.2 osteosarcoma

1.6. Carcinosarcoma

1.7. Carcinoma o sarcoma in tumori benigni

2 FORMAZIONI NEOPLASTICHE BENIGNE

2.1. Adenoma

2.1.1 adenoma semplice

2.1.2 adenoma complesso

2.1.3 adenoma basaloide

2.2. Fibroadenoma

2.2.1 fibroadenoma a bassa cellularità

2.2.2 fibroadenoma ad alta cellularità

2.3. Tumore benigno misto

2.4. Papilloma duttale

FORMAZIONI NEOPLASTICHE NON CLASSIFICATE

3 FORMAZIONI NON NEOPLASTICHE: IPERPLASIE E DISPLASIE

Queste forme comprendono la maggior parte delle lesioni benigne che a loro volta dovrebbero essere distinte in forme *extralobulari* (iperplasie duttali) ed *intralobulari* (iperplasie lobulari). La realizzazione di tale distinzione presenta però notevolissime difficoltà.

Le patologie fibrocistiche possono manifestarsi con una o più delle lesioni di seguito presentate:

3.1 Iperplasia duttale

3.2. Iperplasia lobulare

3.2.1. iperplasia epiteliale

3.2.2. adenosi

3.3. Cisti

3.4. Ectasie duttali

3.5. Fibrosi focale (fibrosclerosi)

3.6. Ginecomastia

Un caso particolare è quello del **CARCINOMA INFIAMMATORIO (O LINFANGECTASIA CARCINOMATOSA)**. Si tratta di una particolare variante molto aggressiva che da un punto di vista istopatologico si caratterizza come un carcinoma scarsamente differenziato/anaplastico con presenza sia di cellule mononucleate che polimirfonucleate e con frequente invasione dei linfatici dermici con metastatizzazione retrograda al popliteo ed edema dell'arto corrispondente (Romanelli capit 7 og217). La diagnosi è per lo più clinica presentando un aspetto macroscopico caratteristico: la massa è scarsamente circoscritta, eritematosa, dolente alla palpazione e tende a diffondere rapidamente verso le altre mammelle, anche contro-laterali. Si possono notare piccoli noduli cutanei diffusi che rappresentano una metastatizzazione diretta della neoplasia. Le metastasi a distanza sono presenti nel 100% dei casi e la prognosi è infausta a breve termine.

Per quanto riguarda l'incidenza in uno studio, il 17% di tutti i tumori mammari analizzati è stato classificato come carcinoma infiammatorio (Perez-Alenza, 2001).

Nel cane il peggioramento prognostico è correlato all'istotipo secondo il seguente ordine di malignità: adenoma, carcinoma complesso, carcinoma semplice, sarcoma, carcinosarcoma.

Cani con sarcoma mammario hanno prognosi peggiore rispetto a cani con carcinomi, eccetto nel caso di carcinoma infiammatorio (Sorenmo, 2003; Withrow et al., 2007).

Nel caso del carcinoma, il sottotipo istologico influenza la sopravvivenza. Si osserva malignità crescente con quest'ordine: tipo non infiltrante, tubulare, solido e anaplastico (Marconato e Del Piero, 2005).

In uno studio condotto su 99 cani, i soggetti con carcinoma anaplastico hanno avuto una minor sopravvivenza postoperatoria (media 2,5 mesi) rispetto ai cani con adenocarcinoma (media 21 mesi), carcinoma solido (media 16 mesi) e altri tipi (media 24 mesi) di tumore (Philibert et al., 2003).

Un altro studio ha trovato una correlazione tra il grado del tumore e il sottotipo istologico: i carcinomi semplici hanno un'elevata percentuale di tumori indifferenziati di grado III (50%) rispetto a quelli di grado I (18%).

I carcinomi infiammatori hanno la prognosi peggiore.

2.3.3.2 Elston-Ellis Grade (1991)

prende in considerazione tre variabili morfologiche della neoplasia:

1- formazioni tubulari

2- pleomorfismo cellulare e nucleare

3- indice mitotico, valutato come il numero totale di mitosi in 10 campi microscopici ad elevato ingrandimento (400X).

Ad ogni variabile è associato un punteggio da 1 a 3:

- ❖ formazione di tubuli:
 - elevate (>75%): 1
 - moderate (10-75%): 2
 - poche o assenti (<10%): 3
- ❖ pleomorfismo cellulare e nucleare:
 - cellule e nuclei piccoli e regolari: 1
 - lieve pleomorfismo cellulare: 2
 - elevato pleomorfismo cellulare: 3
- ❖ indice mitotico:
 - 0-5 mitosi per campo: 1
 - 6-10 mitosi per campo: 2
 - > 11 mitosi per campo: 3

La somma del punteggio finale determina il grado istologico:

- ❖ GRADO I (da 3 a 5) tumore ben differenziato (WDC, well differentiated carcinoma)
- ❖ GRADO II (da 6 a 7) tumore moderatamente differenziato (MDC, moderately differentiated carcinoma)
- ❖ GRADO III (da 7 a 9) tumore scarsamente differenziato (PDC, poorly differentiated carcinoma)

Si tratta della classificazione con il più alto potere predittivo prognostico.

La similitudine morfologica tra cellule neoplastiche e cellule di origine è una caratteristica tipica delle lesioni benigne (adenomi) mentre la mancanza di differenziazione cellulare si riscontra nelle neoplasie maligne.

La scarsa differenziazione (anaplasia) del tumore primario e la presenza di fenomeni necrotici, sembrano favorire il passaggio in circolo degli emboli neoplastici. Da tale considerazione si evince che la prognosi peggiora parallelamente con la perdita di differenziazione.

2.3.3.3 Grado di invasività (Gilbertson et al. 1983)

La stadiazione istologica basata sul grado di invasività (Gilbertson et al. 1983) permette di classificare i carcinomi mammari in 4 gradi:

- ❖ Grado 0: carcinoma *in situ*; la proliferazione maligna è limitata ai bordi anatomici del sistema di dotti della mammella.
- ❖ Grado I: proliferazione maligna estesa allo stroma, senza invasione linfatica-vascolare
- ❖ Grado II: proliferazione maligna invasiva, con invasione linfatica vascolare e metastasi linfonodali.
- ❖ Grado III: proliferazione maligna invasiva, con invasione linfatica vascolare e metastasi a distanza.

In uno studio effettuato su 158 cagne con carcinoma mammario, solo il 19% dei soggetti con carcinoma di grado 0 (*in situ* o non invasivo) ha presentato recidive o metastasi nei 2 anni successivi alla mastectomia contro il 60% dei cani con carcinoma di grado I e il 97% di quelli di grado II. La prognosi è molto buona per i soggetti con carcinoma non invasivo mentre peggiora salendo di grado (Gilbertson et al., 1983).

2.3.3.4 Grado di differenziazione nucleare

È un importante fattore prognostico. Il rischio di sviluppare recidive o metastasi nei 2 anni post chirurgia è del 90% per i cani con tumori scarsamente differenziati, 68% per

quelli con tumori moderatamente differenziati, e solo del 24% in caso di carcinomi ben differenziati (Gilbertson et al., 1983).

2.3.3.5 Evidenza di reattività cellulare linfoide viciniori alla neoplasia

La reattività linfoide intorno al tumore è l'evidenza morfologica della risposta immunitaria antitumorale e si associa a minor percentuale di recidiva dopo la chirurgia. Uno studio ha rilevato che cani con carcinoma mammario che non mostrano evidenza di attività cellulare linfoide al momento della mastectomia hanno un rischio significativamente maggiore di sviluppare recidive rispetto a quelli che mostrano reattività (Gilbertson et al., 1983). Secondo questo studio, cani con tumori di grado I (secondo Gilbertson) che presentano reattività linfocellulare, hanno recidive entro 2 anni nel 45% dei casi, mentre la percentuale sale ad 83% nei soggetti privi di tale reattività; probabilmente questo è correlato ad un'attività citotossica cellulare specifica mediata da linfociti T tumore-specifici.

Risultati opposti sono stati riscontrati in un recente studio eseguito su 51 cagne affette da carcinoma mammario, dove è stata valutata la composizione dell'infiltrato infiammatorio associato al tumore in 24 neoplasie. In tale studio l'intensità dell'infiltrato linfocitario (>600 linfociti) si è rilevato un fattore prognostico negativo poiché associato ad un minor tempo di sopravvivenza.

Differenze significative sono state riscontrate nella composizione dell'infiltrato infiammatorio, in particolare l'infiltrazione elevata di linfociti T CD4+ è stata osservata nei gruppi con prognosi peggiore ed è associata alla progressione tumorale, alla presenza di metastasi e ad una scarsa sopravvivenza mentre la percentuale di linfociti T CD8+ è stata correlata con l'assenza di metastasi ed un maggior tempo di sopravvivenza, suggerendo che queste cellule abbiano un'azione inibitoria sulla progressione tumorale che risulta in un aumento della sopravvivenza (Estrela-Lima et al., 2010).

2.3.3.6 Espressione di fattori angiogenici (VEGF)

L'angiogenesi ha un ruolo fondamentale nella crescita e nella diffusione metastatica di molti tumori solidi.

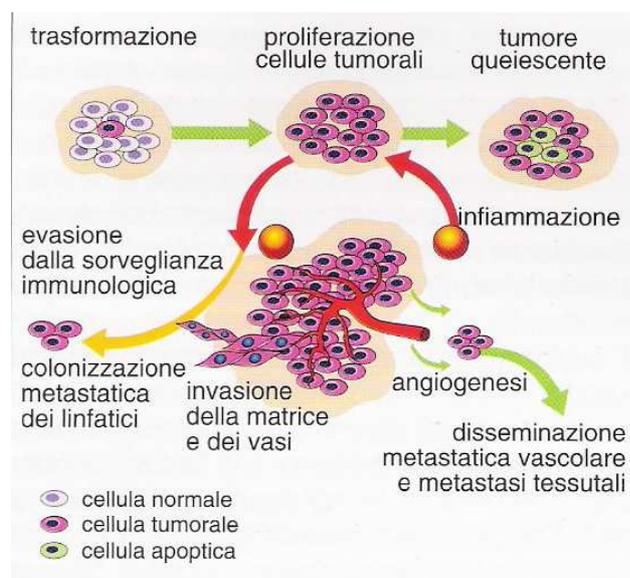


Fig. 2.2 - Angiogenesi e disseminazione metastatica (da Marconato e Del Piero, 2005)

La neoangiogenesi tumorale è molto diversa rispetto alla vascolarizzazione dei tessuti normali sia da un punto di vista morfologico che biochimico. I vasi neoformati hanno

un pattern morfologico del tutto anarchico caratterizzato da un decorso tortuoso e molto irregolare. Inoltre terminano spesso a fondo cieco o formano shunt arterovenosi. L'apporto ematico del tumore è pertanto disorganizzato e caotico e si traduce in inadeguato rifornimento di ossigeno e nutrienti. Paradossalmente, l'ipossia che ne deriva rappresenta un potente stimolo angiogenetico: via via che il tumore si accresce le zone ipossiche aumentano stimolando l'angiogenesi, con conseguente riossigenazione delle aree meno ossigenate del tumore. L'ipossia è considerata pertanto un fattore prognostico negativo ed è associata alla progressione tumorale.

Ad oggi si conoscono più di 20 fattori promotori naturali dell'angiogenesi, tra cui il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), il fattore basico di crescita fibroblastico (bFGF), il fattore di necrosi tumorale, il fattore di crescita piastrinica e la COX-2. Tra i fattori inibitori i più studiati ritroviamo angiostatina, endostatina, interferone α , β e γ , interleuchina-1 e 12, fattore piastrinico 4 e trombospondina-1.

Durante la cancerogenesi, l'equilibrio tra i fattori inibitori e promotori è alterato, per ridotta produzione dei primi o per eccessivo rilascio dei secondi.

Il VEGF è una glicoproteina che promuove la neovascolarizzazione ed è prodotta da numerose cellule, tra cui cellule tumorali, macrofagi, plasmacellule, megacariociti, linfociti e neutrofili, in risposta a stimoli ipossici o infiammatori.

È un potente mitogeno per le cellule endoteliali ed esercita le sue azioni paracrine tramite specifici recettori localizzati sull'endotelio, stimolando l'angiogenesi. È stato ipotizzato che VEGF eserciti anche effetti autocrini, stimolando la crescita neoplastica.

Il VEGF è espresso in numerosi tumori e una sua concentrazione plasmatica elevata è associata ad un tumore che cresce rapidamente, alla presenza di metastasi e ad una ridotta risposta alla terapia. Da questo si evince che l'angiogenesi aumenta con l'incrementare dell'aggressività biologica del tumore: pertanto il VEGF potrebbe essere sfruttato per valutare la malignità ed il potenziale di crescita di alcuni tumori.

Elevati livelli sierici di vari fattori angiogenetici tumorali e l'evidenza, all'istopatologia, di un'aumentata neovascolarizzazione nel tumore, misurata come densità capillare, sono considerati un fattore prognostico importante nel caso di tumori mammari nella donna. Millanta e colleghi, in uno studio del 2006, hanno rilevato che il VEGF è sempre espresso nelle cellule epiteliali tumorali del carcinoma mammario della cagna.

Non hanno inoltre osservato correlazione tra l'espressione di VEGF e i parametri istologici esaminati, quali tipo di tumore, dimensioni e invasione linfatica, e l'outcome clinico della patologia neoplastica. Nel cane, un aumento della vascolarizzazione del tumore non sembra correlato ad un aumento dell'espressione di VEGF (Millanta et al., 2006).

Queiroga e collaboratori hanno invece rilevato un significativo aumento dell'espressione di VEGF nei tumori mammari maligni rispetto a quelli benigni (Queiroga et al., 2010).

La densità vascolare nel tumore (MVD) misura l'intensità dell'angiogenesi ed è riconosciuta con tecniche di immunistochemica (mediante marker come CD31 o l'antigene correlato al fattore VIII) i cosiddetti hot spot vascolari rappresentano le aree del tumore più vascolarizzate e la loro presenza in numero abbondante si associa a prognosi infausta, poiché predittiva di un tumore istologicamente aggressivo e potenzialmente metastatico. L'utilizzo routinario di queste tecniche consentirebbe di individuare quei pazienti che, verosimilmente, beneficerebbero delle terapie antiangiogenetiche.

Nella cagna è stata trovata una correlazione tra densità capillare (MVD) e malignità nei tumori mammari; è stata correlata anche a rischio di recidive, presenza di metastasi linfonodali e differenziazione istologica (Graham e Myers, 2000).

Gli studi sopra citati mostrano risultati discordanti: mentre è certa la correlazione tra MVD e malignità nei tumori mammari, lo stesso non si può dire per il VEGF.

La MVD può fornire importanti informazioni prognostiche mentre per il VEGF sono necessari ulteriori studi.

2.3.3.7 Frazione di crescita

La massa tumorale cresce inizialmente in modo esponenziale, fino al raggiungimento di una popolazione costituita da circa 10⁹ cellule. A questo punto la crescita raggiunge il plateau e il successivo sviluppo è determinato da diverse variabili quali la proliferazione cellulare, il numero di cellule che partecipano attivamente al ciclo cellulare, l'apoptosi, la risposta immunologica dell'ospite ed il numero di cellule che raggiungono il circolo.

Per valutare la proliferazione cellulare di un tumore, si possono utilizzare diversi marcatori (marker), che consentono di predirne il comportamento biologico (recidiva, risposta alla chemioterapia e tasso metastatico). In genere quanto più sono elevati i marker tanto più velocemente si dividono le cellule e tanto più aggressivo è il tumore.

- Indice mitotico: valutato istologicamente, indica il numero di mitosi per campo osservato a 400x.

Esiste una correlazione statisticamente significativa tra l'indice mitotico e l'insorgere di recidiva e/o di metastasi oltre che della morte del soggetto (Innocenti et al., 2009).

- AgNOR (regioni nucleolari organizzate argentate): si tratta di proteine associate ad anse di DNA ribosomiale, siti dove avviene la sintesi proteica. Nelle cellule normali, queste proteine sono organizzate intorno ai nucleoli, mentre nelle cellule maligne disgregano dai nucleoli e tendono a disperdersi nel nucleo. Il numero totale di AgNOR è correlato al numero di cellule che si immettono nel ciclo cellulare e tende ad aumentare con il progredire della velocità del ciclo cellulare. La conta di AgNOR viene fatta su preparazioni ottenute da campioni citologici o istologici fissati in formalina ed è generalmente riportata come numero medio di AgNOR per cellula su 100 cellule neoplastiche valutate (AgNOR 100).

- Antigeni associati alla proliferazione (PCNA, Ki-67): sono rilevati con tecniche di immunostochimica e utilizzati per calcolare l'indice di proliferazione. La valutazione degli antigeni di proliferazione è una tecnica molto più sensibile rispetto alla determinazione dell'indice mitotico. Ki-67 è più labile di PCNA e non viene espresso in G₀. la sua espressione è dimostrata mediante colorazione immunostochimica di campioni istopatologici fissati in formalina, oppure mediante colorazione immunocitochimica di campioni citologici, utilizzando un anticorpo monoclonale (MIB-1). L'espressione è riportata come numero di nuclei Ki-67 positivi su 1000 cellule valutate (indice Ki-67). PCNA è una proteina nucleare non istonica, che funge da cofattore per la DNA polimerasi. Può essere valutato sia su sezioni di tessuto fissate in formalina sia su campioni citologici ed è riportato come numero di nuclei PCNA positivi su 1000 cellule tumorali valutate (indice PCNA).

La frazione di crescita è inversamente proporzionale al volume della massa tumorale. Quindi, a parità di tipologia, il tempo di duplicazione sarà più breve in masse piccole e raggiungerà la massima velocità nelle micro metastasi.

2.3.3.8 Alterazioni molecolari

Alterazioni molecolari, come la mutazione del gene oncosoppressore *p53*, sono state associate ad un fenotipo più maligno e ad una peggiore prognosi in donne con tumore mammario. La mutazione di *p53* è stata valutata anche in diversi studi in ambito veterinario, che hanno dato però risultati discordanti. Alcuni studi non hanno rilevato differenze significative nell'*outcome* tra i cani con o senza mutazione, mentre altri studi riportano un aumento del rischio di recidive e morte sulla base di una correlazione tra

mutazione di *p53* e alto grado istologico del tumore (Fernando et al., 1995; Wakui et al., 2001).

Nel tumore mammario della donna è stata rilevata frequentemente una mutazione del gene oncosoppressore **PTEN** (Perren et al., 1999; Rhei et al., 1997). La perdita dell'attività di PTEN può conferire un aumento della sopravvivenza, del potenziale proliferativo e della capacità invasiva delle cellule tumorali e può promuovere la progressione verso un fenotipo più maligno. Nel tumore

mammario della donna una diminuzione dell'espressione del gene PTEN è stata associata con le grandi dimensioni del tumore e un grado istologico maligno.

Un recente studio eseguito in Medicina Veterinaria ha riscontrato che la diminuzione dell'espressione del gene PTEN, confrontata con i livelli nei tessuti di ghiandole mammarie non neoplastiche, è associata alla malignità nei tumori mammari della cagna (Kanae et al., 2006).

Ressel et al., in uno studio eseguito sui carcinomi mammari della cagna e della gatta, hanno riscontrato nella cagna la perdita dell'espressione di PTEN nel 33% dei carcinomi mammari analizzati. Inoltre hanno rilevato una correlazione significativa tra tale perdita e l'istotipo (carcinoma semplice), l'invasione dei vasi linfatici, la presenza di metastasi linfonodali e di metastasi a distanza, l'insorgenza di recidive ed un minor tempo di sopravvivenza (Ressel et al., 2009).

I risultati degli studi sopra citati suggeriscono che l'analisi dei livelli di espressione di PTEN in cagne affette da tumori mammari può fornire utili informazioni prognostiche.

2.3.3.9 Espressione di recettori per estrogeni e progesterone

I recettori per estrogeni, progesterone e prolattina sono normalmente presenti nel tessuto mammario sano della cagna: circa il 60-77% dei tumori benigni o ben differenziati presenta recettori per gli estrogeni (ER+) e per il progesterone (PR+), mentre quelli maligni sono tendenzialmente ER- e PR.

In uno studio condotto da Millanta e collaboratori, furono valutati l'espressione recettoriale per il progesterone e gli estrogeni su lesioni mammarie: il 100% dei tessuti normali e il 95% di tumori benigni risultarono esprimere recettori per gli estrogeni. Non sono state rilevate differenze significative in termini di quantità di recettori per gli estrogeni presenti tra tessuto normale, displastico, lesioni benigne e in situ, mentre l'espressione recettoriale nei carcinomi invasivi è significativamente più bassa. L'espressione recettoriale per il progesterone è risultata più bassa sia nelle lesioni benigne che in quelle maligne, rispetto al tessuto sano (Millanta et al., 2005).

La dimensione del tumore primitivo si associa a differente espressione recettoriale: la concentrazione di ER e PR tende a diminuire con l'aumentare del volume della neoplasia. L'espressione dei recettori ER diminuisce significativamente con l'ulcerazione cutanea, con la presenza di metastasi linfonodali, con l'età della cagna al momento della diagnosi, con lo stadio clinico avanzato, con il grado istologico elevato e con la malignità istologica del tumore.

Durante la progressione maligna del tumore si ha perdita della dipendenza steroidea; bassi livelli di ER nel tumore mammario primitivo si associano alla presenza di metastasi nel follow-up (Nieto et al., 2000).

Esiste uno studio secondo il quale l'ambiente endocrino del soggetto sembra influenzare l'espressione recettoriale del tumore; un ambiente povero di estrogeni (cagna sterilizzata) favorisce una neoplasia ER-, mentre un ambiente ricco di estrogeni (cagna intera) favorisce una neoplasia ER+. Da questo si deduce che un soggetto intero probabilmente presenterà una neoplasia ER+ e quindi trarrà maggior beneficio dalla terapia ormonale e dalla sterilizzazione.

Un intervallo lungo (superiore ai 2 anni) tra ovariectomia e comparsa del tumore selezionerebbe un subclone ER-, quindi con prognosi peggiore e non rispondente ad un'eventuale terapia ormonale; dopo il secondo calore, sarebbe meglio eseguire l'ovariectomia solo se compaiono neoplasie mammarie o in caso di patologia dell'apparato genitale (Marconato e Del Piero, 2005).

La determinazione dell'espressione recettoriale è molto importante ai fini prognostici in quanto una neoplasia ER+ trarrà maggior beneficio dall'ovariectomia e dalla terapia ormonale, ed avrà quindi una prognosi migliore.

A differenza degli estrogeni, l'espressione recettoriale per il progesterone è risultata più bassa sia nelle lesioni benigne che in quelle maligne, rispetto al tessuto mammario sano della cagna (Millanta et al., 2005). Una sua diminuzione non è quindi rilevante ai fini prognostici.

Per quando concerne le possibili terapie ricordiamo il tamoxifene: è un antiestrogeno non steroideo di sintesi derivato dal trifeniletilene che compete con gli estrogeni per lo stesso recettore citoplasmatico; il complesso tamoxifene-recettore trasloca nel nucleo, dove determina alterazione dei meccanismi di regolazione della sintesi proteica e inibizione della replicazione cellulare. La sua azione si esplica quindi su tutte le forme tumorali che possiedono recettori per gli estrogeni.

Possiede però anche una residua attività estrogenica, che può essere responsabile di endometrite nelle cagne intere e di manifestazioni estrali in quelle sterilizzate. Le opinioni in merito al suo uso sono discordanti, ad esempio Withrow e colleghi ne sconsigliano l'uso (Withrow e Vail, 2007). Nel caso si opti per il suo impiego, va destinato esclusivamente a cagne sterilizzate con tumori mammari ER+.

La dose consigliata è 0,5-2 mg/kg per os una volta al giorno per 6 mesi; se ben tollerato successivamente si può aumentare il dosaggio. Non può essere utilizzato in associazione con chemioterapici citotossici, ma in alternanza successiva (Marconato e Del Piero, 2005).

Il raloxifene, caratterizzato da minore tossicità e maggiore maneggevolezza, e gli inibitori dell'aromatasi, che bloccano la sintesi degli estrogeni, sono gli antiestrogeni di ultima generazione e sembrano essere promettenti.

Per quanto riguarda invece un solo studio preliminare sul possibile utilizzo dell'aglepristone in cani con neoplasie mammarie espimenti PR con risultati promettenti.

A livello mammario sono stati scoperti anche recettori per l'ormone rilasciante l'ormone luteinizzante (GnRH). Il goserelin è un agonista di GnRH ed è in grado di ridurre le dosi circolanti di estradiolo e progesterone, determinando una riduzione dei tumori mammari, il tutto con una tossicità minima (Sorenmo, 2003).

2.3.3.10 Espressione di recettori per COX-2

Il ruolo della ciclossigenasi è critico nella reazione iniziale della cascata metabolica dell'acido arachidonico che porta alla sintesi delle prostaglandine e dei trombossani.

La ciclossigenasi esiste in tre isoforme diverse: COX-1, COX-2 e COX-3. COX-1 è un enzima costitutivo e regola la sintesi fisiologica delle prostaglandine, soprattutto a livello renale e gastrico, dove svolgono un ruolo protettivo. Recentemente è stata scoperta un'altra isoforma dell'enzima ciclossigenasi, la COX-3. In realtà si tratta di una variante della COX-1 per cui molti preferiscono il nome di COX-1b o COX-1v (variante). È coinvolta nell'induzione di dolore e febbre. Nell'uomo è presente solo a livello del Sistema Nervoso Centrale.

COX-2 è assente in condizioni fisiologiche nella maggior parte dei tessuti, ma può essere indotto in risposta a stimoli infiammatori o all'azione di fattori di crescita o di promotori tumorali.

Diversi lavori scientifici hanno inoltre dimostrato che COX-2 è capace di stimolare l'angiogenesi e di inibire l'apoptosi, occupando quindi un ruolo importante nella cancerogenesi.

La prostaglandina E2 (PGE2) è il più importante prodotto di COX-2. PGE2 può stimolare la progressione neoplastica con meccanismo indiretto tramite immunosoppressione, e diretto tramite stimolazione diretta di proliferazione neoplastica e metastasi che si esplica grazie alla promozione della migrazione cellulare, all'aumento dell'invasività e alla stimolazione della neoangiogenesi.

I mediatori della sintesi di PGE2 e la cascata di eventi successiva all'azione di COX-2 possono essere dei target potenziali per la prevenzione e la terapia dei tumori.

Nel tessuto mammario sano del cane non è stata riscontrata espressione della ciclossigenasi-2 (COX-2), mentre è presente nel tessuto neoplastico benigno (24%) e maligno (56%), indicando un possibile ruolo nella genesi del tumore (Dore et al., 2003). Numerosi Autori sono concordi nell'affermare che i livelli di COX-2 sono direttamente correlati al sottotipo istologico del tumore mammario, rilevando livelli più elevati nei sottotipi più maligni. Elevati livelli di COX-2 sono quindi associati ad una prognosi peggiore (Heller et al., 2005; Millanta et al., 2006; Lavallo et al., 2009; Queiroga et al., 2010; Badowska-Kozakiewicz e Malicka,

2010). Al contrario è stato documentato che l'espressione della COX-1 non è correlata al grado di malignità e nemmeno all'evoluzione clinica del tumore (Queiroga et al., 2010).

Il piroxicam (0,3 ml/kg SID) utilizzato a scopo antitumorale sembra dare risultati soddisfacenti ma dato il numero esiguo di casi considerati, sono necessari altri studi per indagare l'effettiva utilità terapeutica.

2.3.3.11 Espressione di HER2

L'overespressione di HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) è comune nella maggior parte dei tumori mammari maligni del cane, con percentuali che vanno dal 17,6% (Martin de las Mulas et al., 2003) al 74% (Ahern et al., 1996). Tali differenze possono essere dovute ai diversi metodi impiegati.

I tumori HER-2 positivi presentano caratteristiche di malignità come grandi dimensioni, elevato grado istologico, crescita di tipo invasivo, assenza di recettori per gli ormoni steroidei. Inoltre, il periodo libero da malattia dopo la chirurgia è inferiore a 6 mesi (Martin de las Mulas et al., 2003; Dutra et al., 2004; Gama et al., 2008). Questi risultati sono in accordo con quanto osservato nel carcinoma mammario della donna, dove l'overespressione di HER-2 è associata ad una prognosi peggiore (Ross e Fletcher, 1998; Sahin, 2000).

2.3.3.12 Nuovi parametri

La *caderina-E* è una molecola di adesione che media la coesione calcio dipendente tra le cellule epiteliali e che inibisce l'invasione tumorale. Essa si perde con l'aumentare della malignità della neoplasia, consentendo alle cellule di staccarsi dagli aggregati e di raggiungere il circolo ematico.

La presenza di caderina-E è valutata mediante immunistochemica. Bassi livelli di caderina-E ed una distribuzione anomala si associano a prognosi peggiore, perché correlati ad un fenotipo invasivo e metastatico (Brunetti et al., 2005; Rodoe Malicka, 2008).

L'*aneuploidia*, identificata con la citometria a flusso, indica la presenza di un numero anormale di cromosomi e si correla a prognosi peggiore rispetto a quei tumori in cui esiste diploidia, ovvero cromosomi complementari normali.

L'aneuploidia riflette l'instabilità genetica del tumore.

2.3.4 FATTORI PROGNOSTICI LEGATI AL PROCESSO METASTATICO

Si intende per metastasi “la diffusione di cellule neoplastiche da un tumore primario a una sede non contigua, dove si stabilisce una crescita secondaria” (Romanelli, 2007). Tale processo può avvenire per via ematica o linfatica.

Le metastasi devono essere considerate come il risultato dell’alterazione dei meccanismi di regolazione genica che si producono in una piccola percentuale della popolazione cellulare tumorale. In seguito a questa trasformazione le cellule acquistano determinate proprietà, tra cui quella di disseminarsi. La facoltà di dare origine a colonie secondarie in altri distretti dipende dalla capacità delle cellule neoplastiche di invadere la rete linfatica e/o capillare, superare i danni meccanici subiti durante la disseminazione e di moltiplicarsi nell’organo che hanno raggiunto.

Il processo metastatico è complesso e mediato anche dalla risposta soggettiva dell’organismo colpito. Si parla di “cascata metastatica” proprio per indicare la patogenesi per passi successivi:

1. *Distacco dal tumore primario*: il processo sembra favorito da rapida crescita della massa primaria, necrosi tumorale, stress meccanici e aumento dell’attività di determinati enzimi cellulari (proteasi) o inefficienza di molecole che favoriscono l’adesione cellulare.

2. *Invasione*: la cellula deve raggiungere il vaso, ematico o linfatico, e penetrare al suo interno. In alcuni casi tale compito è facilitato dalla scarsa resistenza dei vasi tumorali neoformati, talvolta invece il passaggio richiede la penetrazione attraverso la membrana basale che deve essere lisa da enzimi cellulari (collagenasi), prodotti direttamente dalle cellule tumorali, oppure da macrofagi da queste richiamati. Lo stesso deve avvenire per i capillari linfatici, non presenti nella massa neoformata.

3. *Evasione dal sistema di difesa dell’ospite*: nel torrente circolatorio o nei linfonodi le cellule tumorali sono aggredite dalle cellule del sistema immunitario dell’ospite. Linfociti T, granulociti neutrofili, macrofagi e cellule natural killer (NK) accorrono in massa distruggendo gran parte delle cellule “estrane”. Inoltre nel torrente circolatorio queste ultime devono contrastare le sollecitazioni meccaniche legate al flusso e sopravvivere sia alla carenza di sostanze nutritive sia alla tossicità dell’eccesso di ossigeno. I linfonodi regionali, grazie alla elevata concentrazione di cellule NK e linfociti T citotossici, rappresentano una vera e propria barriera alla diffusione del tumore.

4. *Arresto*: l’aggregazione di cellule tumorali tra loro e con piastrine e leucociti ne consente l’arresto e l’adesione alla parete vasale. La formazione del trombo, inoltre, fornisce una protezione contro i traumi meccanici e l’aggressione da parte delle cellule del sistema immunitario dell’ospite. Generalmente il trombo si arresta nei punti in cui il letto capillare è più fitto (polmone, fegato), ma è comunque dimostrata una selettività da parte di determinati tipi neoplastici per le cellule endoteliali di organi specifici. Si ipotizza che ciò sia dovuto a fattori chemio tattici prodotti dalle cellule, a fattori di crescita e a componenti della matrice extracellulare.

5. *Stravasamento*: una volta avvenuta l’adesione alla parete interna del vaso si verifica il processo inverso alla sua invasione. Si ha quindi l’infiltrazione delle cellule tumorali tra quelle endoteliali mediante emissione di pseudopodi, lisi e invasione della membrana basale grazie all’azione di enzimi proteolitici quali attivatore del plasminogeno, catepsine e metalloproteinasi. Una volta digerita la membrana basale gli pseudopodi delle cellule tumorali si infiltrano nello spazio extracellulare, consentendo loro di insediarsi. In tal modo si apre una via attraverso cui le cellule adese alle prime possono a loro volta colonizzare e iniziare la nuova crescita tumorale.

6. *Nuova crescita tumorale*: una volta insediata nella matrice extracellulare, la cellula tumorale deve poter sopravvivere e moltiplicarsi per originare una nuova massa. Questo processo è mediato dalla presenza di fattori di crescita specifici che possono essere prodotti direttamente dalla cellula (autocrini) o essere presenti nell'ambiente in quanto secreti direttamente dall'organo bersaglio (paracrini). Le cellule che producono in modo autocrino i fattori di cui necessitano possono generare metastasi in qualsiasi sede, mentre le cellule che necessitano un meccanismo di tipo paracrino possono dar luogo a metastasi solo negli organi specifici. A tal proposito va ricordata la teoria del "seme e terreno" elaborata da Paget nel 1889 secondo la quale vi sarebbero vere e proprie interazioni tra organo bersaglio e cellule neoplastiche, probabilmente mediate da fattori chemiotattici. Le cellule necessitano inoltre di un adeguato supporto vascolare e devono quindi essere in grado di indurre la neoformazione di vasi (angiogenesi). Questo avviene mediante la secrezione di fattori di crescita, quali fattore basico di crescita dei fibroblasti (b-FGF), angiogenina, prostaglandine e fattori di crescita trasformanti (TGF- α e - β).

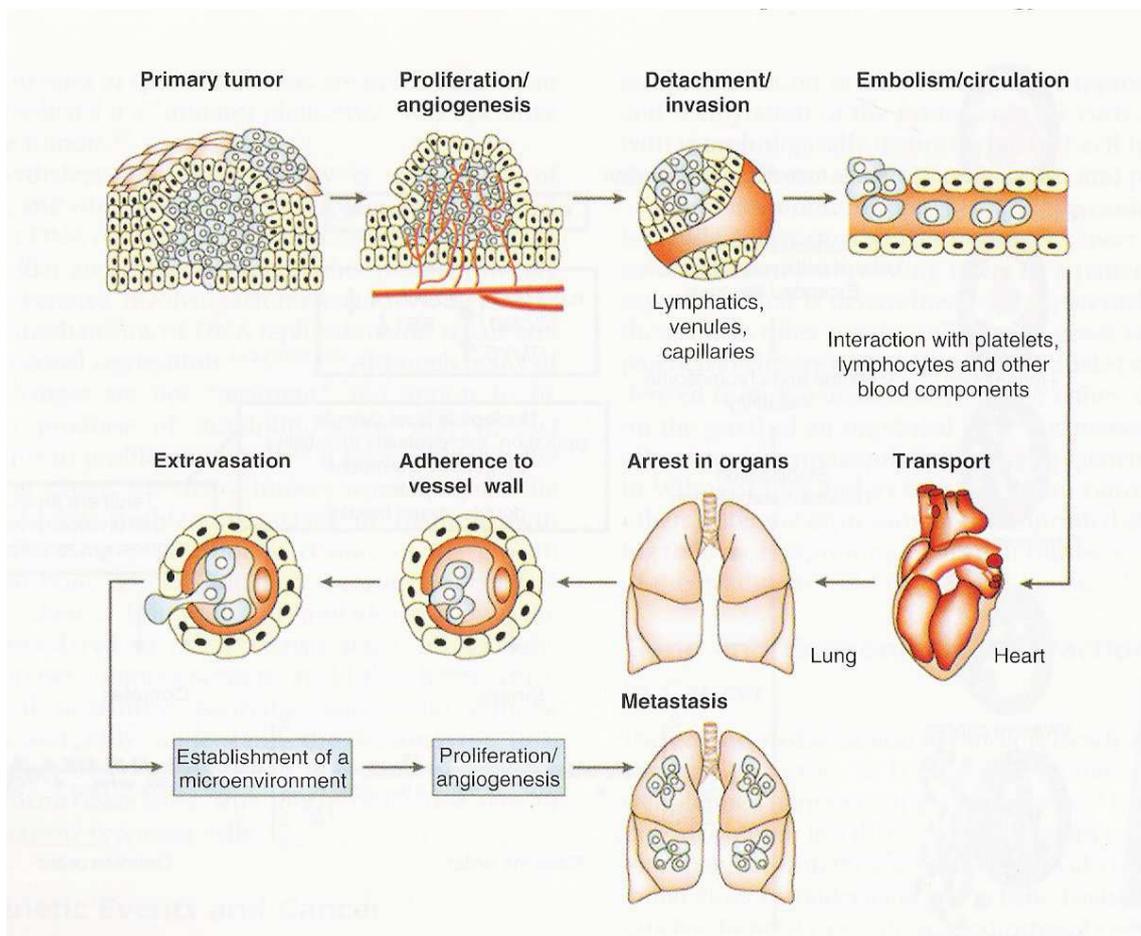


Fig 2 .3 - Rappresentazione della cascata metastatica (da Withrow, 2007)

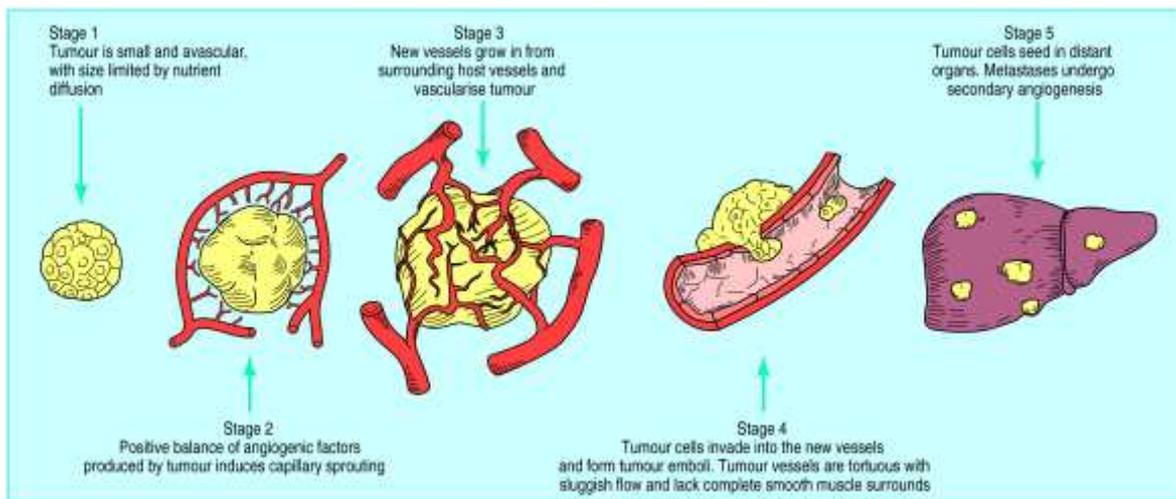


Fig. 2.4 - Rappresentazione delle principali fasi del processo metastatico

Le metastasi, e non il tumore primario, sono causa di morte nel 90% dei pazienti con tumore. E' quasi impossibile asportarle chirurgicamente senza compromettere funzioni vitali del corpo.

Lesioni secondarie sono generalmente più resistenti alle terapie rispetto ai tumori primari poiché istologicamente più indifferenziate.

Le metastasi non controllate possono distruggere la normale architettura del tessuto "ospite" causando erosione strutturale, ostruzione di passaggi vitali, dolore e significativa perdita di funzioni.

I carcinomi mammari metastatizzano principalmente per via linfatica ai linfonodi regionali, per poi raggiungere attraverso i vasi linfatici più grandi la circolazione sanguigna ed infine le sedi di metastasi a distanza.

Nella mammella fisiologica le mammelle toraciche (T1 e T2) sono drenate dai linfonodi ascellari, le mammelle inguinali (I) e addominali caudali (A2) dai linfonodi inguinali superficiali e le mammelle addominali craniali (A1) possono drenare in entrambe le direzioni. Nella cagna, a differenza di quanto avviene nella gatta, non ci sono interconnessioni tra i vasi linfatici delle due file.

In corso di malattia neoplastica, e tanto più quanto più questa è aggressiva, si assiste al fenomeno della neoangiogenesi. Gli eventuali criteri di sviluppo di nuove connessioni linfatiche in corso di carcinoma mammario non sono stati ancora studiati nel dettaglio nella cagna ma studi preliminari sembrerebbero evidenziare l'effettiva assenza di una via di diffusione preferenziale dipendente dalla localizzazione (vedi paragrafo asportazione linfonodale).

possibilità che la diffusione delle cellule neoplastiche non segua le vie linfatiche "classiche", soprattutto nel caso di neoplasie maligne accompagnate spesso da linfoangiogenesi.

Uno studio di Patsikas e colleghi del 2006 ha messo in evidenza, tramite linfografia il decorso della linfa nel plesso linfatico mammario di cagne affette da neoplasia mammaria, rilevando che talvolta il drenaggio linfatico dei tessuti neoplastici può subire variazioni. Secondo i dati raccolti da questa indagine le mammelle toraciche neoplastiche possono essere drenate anche direttamente dal linfonodo sternale e le mammelle addominali craniali a volte vengono drenate anche dai linfonodi iliaci mediali. La mammella inguinale neoplastica occasionalmente drena anche nel linfonodo popliteo omolaterale e in un plesso linfatico della faccia mediale della coscia ipsilaterale. In un solo caso si dimostravano connessioni linfatiche tra la ghiandola mammaria neoplastica e le ghiandole normali adiacenti (Patsikas et al., 2006).

Concludendo possiamo quindi dire che ad oggi in Medicina Veterinaria è molto difficile prevedere quale sarà la via linfatica attraverso la quale potrà diffondersi il fenomeno metastatico di un tumore particolarmente aggressivo.

Studi recenti eseguiti nel cane con l'utilizzo di traccianti radioattivi e gamma-camera e scintigrafia dimostrano proprio l'imprevedibilità di tali fenomeni.

Alla luce di questo e come considerazione generale bisogna dire che le indicazioni sopra riportate per i diversi approcci chirurgici sono del tutto indicative e ben lontane dall'essere unanimemente accettate da tutti.

Le sedi metastatiche più frequenti sono:

- **Linfonodi regionali (ascellari e inguinali)**
- **Torace: polmoni, pleure, linfonodi mediastinici, tracheobronchiali e sternali.**

Le metastasi polmonari raramente producono segni clinici nelle fasi iniziali e sia lo stato clinico del soggetto che l'auscultazione toracica sono normali. Questo è dovuto al fatto che solitamente le metastasi polmonari interessano l'interstizio polmonare piuttosto che gli alveoli. Con il progredire del processo la dispnea diventa il segno clinico più frequente mentre tosse ed emottisi sono rare. La dispnea può essere dovuta all'ipossiemia associata all'aumento del tessuto intrapolmonare o all'edema interstiziale secondario all'occlusione dei vasi linfatici (Thrall, 1979).

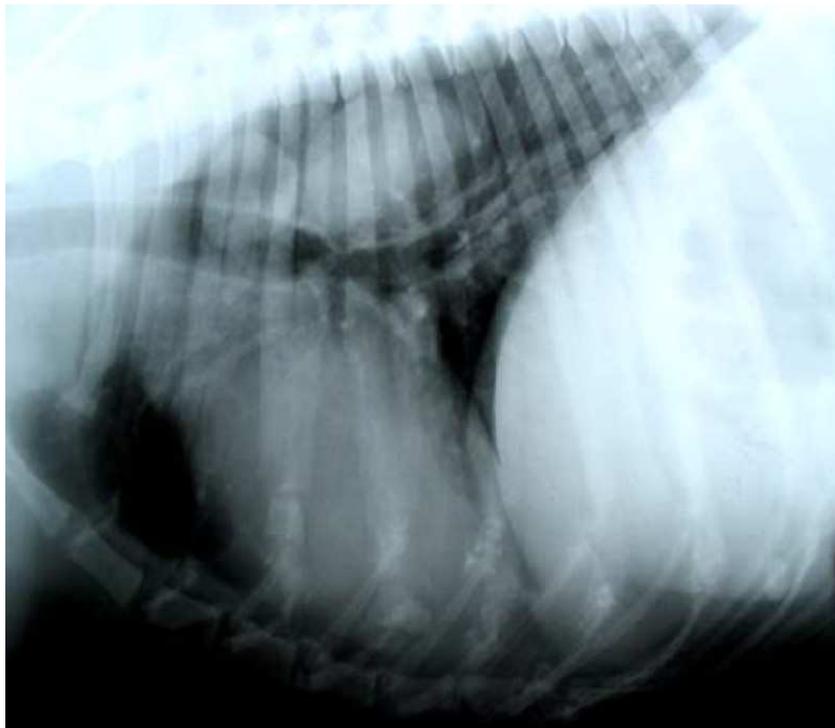


Fig. 2.5 - Pattern interstiziale strutturato. Aree nodulari alla base del cuore in posizione sovra-illare riferibili a linfonodo tracheo-bronchiale mediano e formazione nodulare a livello del lobo apicale sinistro del polmone

Dipartimento di Clinica Veterinaria – Università degli Studi di Pisa

Il versamento pleurico si presenta solo raramente nel cane mentre nel gatto rappresenta spesso il più precoce segno di invasione metastatica del torace.

- **Addome: fegato, linfonodi sottolombari, linfonodi iliaci mediali, milza e Rene**

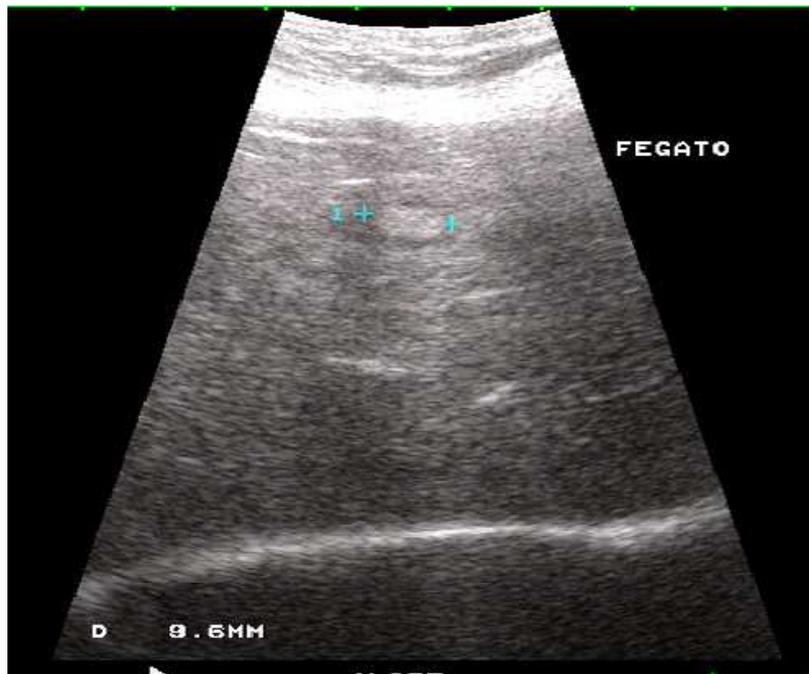


Fig 2.7 Immagine ecografica a “bersaglio” riferibile a metastasi epatica.
Dipartimento di Clinica Veterinaria – Università degli Studi di Pisa

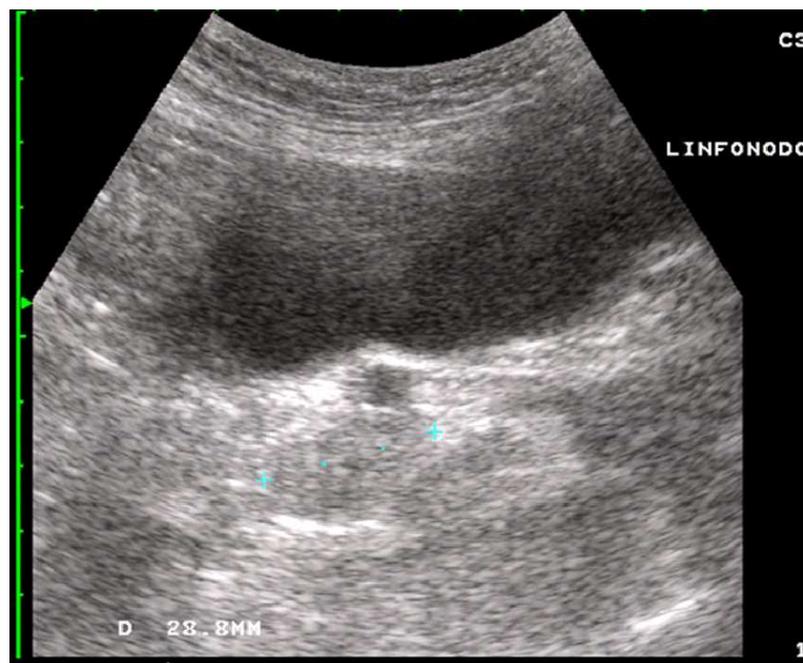


Fig 2.8 - Linfadenopatia iliaca con aumento di volume, modificazione
nella forma e dell'ecogenicità del linfonodo.
Dipartimento di Clinica Veterinaria - Università degli Studi di Pisa

- **Scheletro: vertebre lombosacrali, coste, estremità prossimali dell'omero e del femore.**

I soggetti con metastasi allo scheletro appendicolare mostrano zoppia dell'arto interessato. In caso di metastasi allo scheletro assiale i soggetti possono presentare dolore, una visibile o palpabile massa a livello di una costa, oppure segni di mielopatia secondaria ad una compressione del midollo spinale dovuta ad una lesione vertebrale (Cooley e Waters, 1998). In presenza di questi segni secondari è quindi opportuno indagare mediante radiografie mirate alla ricerca di eventuali metastasi ossee che,

seppur rare, sono un'evenienza plausibile. All'esame radiografico le metastasi scheletriche si presentano con aree di lisi.



*Fig. 2.9 - Area di lisi ossea riferibile a metastasi da carcinoma mammario.
Dipartimento di Clinica Veterinaria - Università degli Studi di Pisa*

- Ulteriori siti di metastasi possono essere **il cuore, le ghiandole surrenali ed il cervello** (Ettinger et al, 2002).

Nella donna l'encefalo è frequentemente sede di metastasi da carcinoma mammario.

Si ritiene che l'incidenza nel cane sia sottostimata a causa della non routinarietà di esami specifici per l'indagine del tessuto cerebrale come la RM (risonanza magnetica).

Ogni qualvolta un paziente con anamnesi di carcinoma mammario presenti una sintomatologia centrale è necessario porre il sospetto di metastasi cerebrale. Data però ad oggi l'assenza di terapie oggettivamente efficaci in medicina veterinaria per contrastare la progressione di tale evento si pone il problema etico nel sottoporre il soggetto in anestesia generale per l'esecuzione di una RM al solo scopo conoscitivo, considerando anche la spesa economica da parte del proprietario.

2.3.4.1 Metastasi linfonodali

La presenza di metastasi linfonodali è uno dei principali fattori prognostici negativi infatti rappresenta il punto di passaggio tra malattia d'organo e malattia sistemica (tra stadio III e IV TNM). A tal proposito esistono numerosissimi studi.

L'80 % dei soggetti con interessamento linfonodale presenta recidive entro 6 mesi dalla chirurgia (Gilbertson et al., 1983; Kurzman e Gilbertson, 1986; Yamagami et al., 1996).

Anche Karayannopoulo e collaboratori riportano che le metastasi linfonodali hanno un impatto decisamente negativo sulla sopravvivenza. Durante un followup di 2 anni l'evento morte si è presentato nell'86% dei soggetti con metastasi linfonodali rispetto al 21% dei soggetti con linfonodi negativi (Karayannopoulo, 2005).

L'eventualità della presenza di metastasi linfonodale deve essere valutata ogni qual volta si ponga la diagnosi (o anche solo il sospetto diagnostico) di carcinoma mammario. Un aumento delle dimensioni e della consistenza del linfonodo aumenta ovviamente le probabilità di un suo coinvolgimento ma si tratta di un rilievo decisamente aspecifico poiché una linfadenomegalia può riconoscere numerose altre cause (infiammatorie, infettive). Dimensioni linfonodali normali non possono tuttavia

portare all'esclusione del processo metastatico infatti questo comporta un aumento di dimensioni e consistenza solo in fasi avanzate, per cui anche la sensibilità della palpazione è da considerarsi scarsa. Per queste ragioni in caso di linfadenomegalia è buona pratica procedere con approfondimenti diagnostici quali l'esecuzione un FNB (Fine Needle Biopsy) comprendente sia tecniche di agoaspirazione (FNA) che tecniche di ago infissione (FNCS). Tali tecniche hanno elevatissima specificità ma scarsa sensibilità soprattutto nelle fasi precoci dell'invasione metastatica del linfonodo.

Per tali ragioni una negatività a questo tipo di test non ci permette di escludere l'interessamento metastatico mentre una positività ce ne dà l'assoluta certezza.

Anche studi effettuati su donne con tumore mammario hanno rilevato che il solo esame fisico non è abbastanza accurato per determinare l'interessamento del linfonodo ascellare; pazienti con linfonodi ingrossati e palpabili possono avere solo una reazione infiammatoria e linfonodi che appaiono normali possono essere interessati da metastasi (De Freitas R. et al., 1991).

In alternativa alla FNB è possibile eseguire un prelievo bioptico con diversi metodi. Questo metodo ha una sensibilità maggiore dei precedenti mettendo a disposizione del patologo una quantità maggiore di tessuto del quale potrà inoltre valutare la citoarchitettura. Un ulteriore aumento della sensibilità lo otteniamo eseguendo l'escissione completa del linfonodo. Con tale metodo la sensibilità aumenta poi in maniera direttamente proporzionale con il numero di sezioni eseguite dal patologo. Nella donna il linfonodo sentinella viene sezionato in fette dello spessore di 150 micron raggiungendo una sensibilità diagnostica estremamente elevata. Va però sottolineato che le ultime due tecniche riportate (biopsia chirurgica ed asportazione linfonodale) hanno una invasività decisamente maggiore essendo procedure chirurgiche che necessitano di anestesia. Inoltre può risultare difficoltoso il reperimento stesso di talune stazioni linfonodali quando queste non siano significativamente aumentate di volume (es: linfonodo ascellare).

In tale sede ci pare opportuno sottolineare il fondamentale ausilio per il campionamento linfonodale fornito negli ultimi anni dalle moderne tecniche di diagnostica per immagini. In particolare è diventata ormai routinaria l'esecuzione di FNB e biopsie eco o TC guidate. Tali tecniche aumentano notevolmente la sensibilità di tali esami permettendo una valutazione strutturale della lesione da campionare consentendoci di indirizzare la nostra attività sulle aree che ci appaiono più significative.

Riportiamo anche uno studio eseguito nel 2001 da Langenbach et al. su cani con differenti tipi di tumori che riporta una sensibilità della citologia linfonodale per la ricerca di metastasi intorno al 100%. Tale risultato contrasta con tutta la letteratura sull'argomento sia umana che veterinaria ed è a nostro avviso plausibile solo se il suddetto studio fosse stato effettuato in soggetti con metastasi linfonodali estremamente avanzate, e quindi con completa destrutturazione e disarchitettura della ghiandola.

Secondo alcuni autori, il coinvolgimento degli organi distanti senza il coinvolgimento dei linfonodi regionali è abbastanza infrequente, così come non si riscontrano facilmente lesioni epatiche, ossee o spleniche, senza interessamento polmonare (Marcato e Sarli, 2002).

Tuttavia altri Autori ritengono che il linfonodo regionale costituisce più una barriera funzionale che anatomica, e circa il 60% delle cellule tumorali possono semplicemente attraversarlo raggiungendo altre stazioni (Gilson, 1995). Alcuni studi hanno evidenziato la possibilità che il processo metastatico "salti" il linfonodo regionale tributario andando a colpire direttamente linfonodi distanti od organi parenchimatosi (Gilson, 1995; Helleme, 1993). Tali studi offrono a nostro avviso diversi spunti di discussione. In particolare sarebbe interessante valutare l'accuratezza con la quale viene studiato il linfonodo per la ricerca di metastasi in Medicina Veterinaria. Inoltre, se effettivamente

si dovesse confermare la possibilità di “salto” delle stazioni linfonodali regionali tributarie, sarebbe di fondamentale importanza poter ricorrere a tecniche per la valutazione dei processi linfoangiogenetici che accompagnano la cancerogenesi mammaria.

Tali pratiche sono oramai routinarie nell’approccio al carcinoma mammario della donna dove l’individuazione del linfonodo sentinella, cioè il primo raggiunto dalla rete linfatica a partenza dal tumore è oramai una prassi irrinunciabile.

Il rilevamento dell’interessamento linfonodale è essenziale per una corretta classificazione della neoplasia. In Medicina Veterinaria è ancora problematica l’identificazione del “linfonodo sentinella” per la mancanza di mezzi diagnostici adeguati.

Nella donna, in caso di metastasi, il carcinoma mammario si diffonde attraverso il sistema linfatico seguendo un percorso ordinato e progressivo, interessando in primo luogo i linfonodi più esterni o del “primo livello linfonodale”. Identificare il primo linfonodo (all’interno del pacchetto ascellare che nella donna è costituito da molti linfonodi) sede di drenaggio di un particolare tumore permette di ottenere dall’analisi istopatologia accurata di questo le dovute informazioni riguardo alla eventuale diffusione neoplastica. La positività del cosiddetto linfonodo sentinella è dunque il segnale di un coinvolgimento a distanza mentre la sua negatività può indicare l’assenza di tale coinvolgimento. In questo modo si può valutare l’effettiva utilità di una chirurgia più invasiva con la necessità dell’asportazione in blocco del pacchetto ascellare che comporta notevoli conseguenze cliniche sulla donna che lo subisce. Inoltre tale tecnica ha portato con sé un notevolissimo aumento del livello di confidenza nella valutazione della N nel TNM in Medicina umana. Infatti dovendo analizzare un solo linfonodo e non tutti i 20-25 linfonodi del pacchetto è possibile procedere con un esame molto più accurato dello stesso.

Nel 1994 Giuliano e collaboratori hanno riportato per primi la loro esperienza con l’uso di un colorante vitale (il Blu di Evans) iniettato intorno alla sede del tumore primitivo per la ricerca del linfonodo sentinella nel cancro della mammella (Giuliano et al., 1994). La tecnica del mappaggio intraoperatorio è stata poi descritta con l’uso di radioisotopi (tecnezio marcato) e l’ausilio di una sonda intraoperatoria a raggi gamma. La tecnica del mappaggio riesce, in mani esperte, ad identificare il linfonodo sentinella in più del 90% dei casi. L’uso di entrambe le metodiche sembra aumentare la percentuale di successo (Albertini et al., 1996). Quando identificato, la correlazione tra linfonodo sentinella e stato linfonodale reale della paziente è molto significativa: il valore predittivo in caso di negatività è intorno al 95%. Ciò significa che in una bassa percentuale di casi (circa il 5%) la tecnica del linfonodo sentinella può dare risultati falsamente negativi. Tuttavia, questo svantaggio può essere controbilanciato da una migliore stadiazione del linfonodo sentinella, in quanto lo studio dell’anatomopatologo con sezioni seriate e con l’immunoistochimica può portare alla identificazione di micrometastasi non valutabili con le tecniche convenzionali. Ciò avviene in circa il 10-20% dei casi.

2.3.4.2 Metastasi a distanza

È un fattore prognostico estremamente negativo rappresentato dal passaggio in stadio V del TNM.

La frequenza di metastasi riportata nei diversi studi è estremamente variabile.

Marcato e Sarli la stimano vicina o superiore al 50% dei casi (Marcato e Sarli, 2002).

In un recente studio, la sopravvivenza media postoperatoria fu di 5 mesi contro i 28 mesi dei cani senza metastasi al momento della presentazione (Philibert et al., 2003).

Helleman in uno studio retrospettivo condotto su 202 cani affetti da tumore mammario con evidenti caratteristiche istologiche di malignità, ha rilevato che l’80% dei soggetti è

deceduto in seguito a disseminazione metastatica nei due anni dalla rimozione chirurgica del tumore primario, più frequentemente entro l'anno post-chirurgia. Inoltre, dall'esame post-mortem è emerso che il 50% dei soggetti aveva metastasi linfonodali e l'80% aveva metastasi ai polmoni (Hellemen, 1993).

Uno studio di Patsikas e colleghi del 2006 ha messo in evidenza, tramite linfografia, il decorso della linfa nel plesso linfatico mammario di cagne affette da neoplasia mammaria, rilevando che talvolta il drenaggio linfatico dei tessuti neoplastici può subire delle variazioni. Secondo i dati raccolti da questa indagine le mammelle toraciche neoplastiche possono essere drenate anche direttamente dal linfonodo sternale e le mammelle addominali craniali a volte vengono drenate anche dai linfonodi iliaci mediali. La mammella inguinale neoplastica occasionalmente drena anche nel linfonodo popliteo omolaterale e in un plesso linfatico della faccia mediale della coscia ipsilaterale. In un solo caso si dimostravano connessioni linfatiche tra la ghiandola mammaria neoplastica e le ghiandole normali adiacenti (Patsikas et al., 2006).

Tale dato supporta l'ipotesi di alcuni Autori i quali ritengono che il linfonodo regionale costituisce più una barriera funzionale che anatomica, e circa il 60% delle cellule tumorali possono semplicemente attraversarlo raggiungendo altre stazioni (Gilson, 1995). Vista la non conclusività delle conoscenze attuali riguardo alla neoangiogenesi e linfoangiogenesi non è a nostro avviso possibile escludere che il linfonodo considerato come il regionale primo tributario in realtà non lo sia.

DIAGNOSTICA PER IMMAGINI: Come detto la presenza delle metastasi a distanza è un fattore prognostico estremamente negativo ed in medicina veterinaria porta con sé la prognosi infausta. Questo rende evidente l'importanza di poter disporre di mezzi diagnostici specifici e sensibili.

La diagnostica per immagini attualmente a disposizione in ambito veterinario è costituita dalla radiologia, l'ecografia, la TC (tomografia computerizzata) e la RMN (risonanza magnetica).

La **radiologia** è lo strumento screening per la ricerca di metastasi toraciche nel paziente oncologico. Per una corretta interpretazione è necessaria l'esecuzione di almeno tre proiezioni: latero-laterale destra, latero-laterale sinistra e dorso-ventrale. Si tratta di una tecnica dotata di moderata sensibilità poiché consente di visualizzare solo i noduli di diametro superiore a 4-5 mm con conseguente rischio di avere dei falsi negativi. L'avvento negli ultimi anni della radiologia digitale anche in medicina veterinaria ha permesso di evidenziare anche lesioni di dimensioni inferiori fornendo immagini dotate di una migliore qualità ed una più alta risoluzione. Tale tecnica permette inoltre di ingrandire parti selezionate della radiografia consentendo di rilevare anche lesioni molto piccole.

Per poter trarre il massimo vantaggio diagnostico, le immagini digitali vanno osservate su monitor utilizzando, se necessario, dei software di elaborazione dell'immagine per migliorare la visualizzazione di dettagli utili ai fini diagnostici e per ottenere valutazioni dimensionali quantitative accurate.

Oltre alle dimensioni di una lesione anche la sua posizione può renderne difficile l'identificazione. In particolare aumenta la possibilità di falsi negativi per lesioni localizzate in zone con scarso contrasto quali l'ilo polmonare, il recesso paraspinale ed il recesso costodiaframmatico.

Un altro importante fattore che influenza la sensibilità dell'indagine radiografica del torace è il grado di insufflazione del parenchima polmonare. Quanto più sarà insufflato il polmone maggiore sarà il contrasto ottenuto. Per una corretta interpretazione è necessario che il parenchima polmonare sia ben insufflato in modo da ottenere con l'aria un contrasto adeguato. Nel decubito laterale non si può valutare adeguatamente il

polmone più declive perché meno insufflato, è per questo che si rende necessaria l'esecuzione di entrambi i decubiti, destro e sinistro, oltre sempre al decubito ventrodorsale.

Fatte queste doverose considerazioni tecniche riguardo alla sensibilità della radiologia del torace ci pare opportuno sottolineare l'enorme influenza esercitata su questo aspetto da parte dell'esperienza del radiologo che andrà ad interpretare l'esame.

Può comunque capitare di trovarsi di fronte a casi dubbi nei quali è diventata oramai prassi anche in Medicina Veterinaria il ricorso a tecniche diagnostiche di secondo livello, in particolare indagini TC multistrato.

Vista la diffusione che gli apparecchi TC stanno avendo sul nostro territorio è plausibile ed auspicabile ritenere che la TC sostituirà nel prossimo futuro la radiologia come esame di screening per la ricerca di metastasi toraciche nel paziente oncologico. Per quanto concerne invece la specificità dell'esame radiografico del torace nel paziente oncologico (cioè la capacità di discriminare lesioni neoplastiche da lesioni di altra natura), questa è stimata intorno al 97% (Suter et al, 1974) per le forme interstiziali strutturate (nodulari).

Una specificità del 97% è un valore decisamente buono. Sta a significare che le metastasi polmonari sono difficilmente confondibili con altri tipi di lesione, per lo meno nel Continente Europeo dove sono praticamente assenti le forme micotiche polmonari e le forme tubercolari.

La difficoltà può risiedere nel distinguere eventuali lesioni metastatiche singole da primari polmonari o forme ascessuali.

Nei casi dubbi è opportuno ricorrere all'ausilio di tecniche diagnostiche citoistopatologiche con relative indagini immunoistochimiche al fine di poter identificare con certezza la natura della lesione. I prelievi necessari possono essere eseguiti a cielo coperto con l'ausilio e la guida di tecniche di diagnostica per immagini, principalmente ecografia e TC.

La radiologia viene impiegata anche per la ricerca di metastasi ossee ma ricordiamo che nella cagna lo scheletro è sede di metastasi da carcinoma mammario solo raramente a differenza di quanto avviene nella donna. In quest'ultima l'esame di screeneg per tale indagine è la scintigrafia che richiede un radio tracciante. Tale metodica disponibile in Medicina Veterinaria solo in rari casi. Generalmente si procede con l'indagine radiografica in caso di insorgenza di sintomatologia (per esempio una zoppia). Vista la scarsa frequenza di metastasi ossee da carcinoma mammario, nel caso in cui si rilevi una lesione dubbia è sempre opportuno procedere con prelievi cito-istopatologici al fine di identificare con certezza la natura della lesione.

L'**ecografia** è la tecnica di screening per la ricerca di eventuali lesioni metastatiche a livello addominale. La sensibilità di tale esame è fortemente influenzata dall'esperienza dell'operatore e dalla qualità della macchina. Inoltre non è sempre possibile avere un soggetto adeguatamente preparato ed un colon e/o uno stomaco pieni d'aria causano importanti distorsioni alla diffusione delle onde ultrasonografiche riducendo notevolmente l'accuratezza dell'esame.

Possiamo comunque dire che mediamente si tratta di una metodica dotata di una buona sensibilità

La specificità è invece bassa poiché generalmente le immagini di lesioni metastatiche addominali sono comuni ad altre condizioni patologiche. Fanno eccezione le lesioni metastatiche a livello epatico e splenico che superino il cm di dimensione poiché queste tendono ad assumere un aspetto tipicamente "a bersaglio" per l'alternarsi di cerchi concentrici ipo-iperecogeni dovuti ad aree di necrosi alternate ad aree di produzione. Tali lesioni sono da considerarsi tipicamente patognomoniche di metastasi di neoplasie epiteliali, anche se non specificamente di quelle originatesi da un primario mammario.

Nei casi dubbi è sempre buona prassi procedere con campionamenti citoistopatologici ecoguidati.

Talvolta è possibile ricorrere all'indagine ecografica per tentare differenziare una lesione benigna da una maligna partendo dal presupposto che tendenzialmente i tumori mammari maligni presentano margini per lo più irregolari con ecogenicità da struttura disomogenea per l'alternarsi di aree ipo ed iperecogene; le lesioni benigne tendono invece ad avere margini distinti e regolari, forma sferica od ovale e hanno pattern ecografico interno omogeneo. Rimane comunque evidente il fatto che l'ultima parola per determinare la natura di una lesione neoplastica spetta comunque all'esame citoistopatologico.

Per quanto concerne invece l'aspetto delle metastasi linfonodali consideriamo che un linfonodo normale appare ecograficamente come una struttura ovalare di forma allungata, ipoecogena, omogeneo delimitato da una capsula più ecogena. L'esame Doppler può consentire di identificare una regione ilare ricca di vasi che si distribuiscono in modo regolare dal centro verso la periferia. In caso di linfoadenomegalia i linfonodi tendono ad assumere un aspetto più globoso e diventano ancora meno ecogeni. Una linfoadenomegalia di origine infiammatoria non è ecograficamente differenziabile da una di origine neoplastica a meno che non ci si trovi di fronte a processi metastatici molto avanzati nel caso dei quali è possibile rilevare la disarchitettura del parenchima o la presenza di lesioni nodulari. In caso di linfoadenomegalia di linfonodi addominali è sempre opportuna l'esecuzione di FNA eco guidato o biopsia e successivo esame citologico-istopatologico.

La **Tomografia Computerizzata** non è ancora un esame di screening in medicina veterinaria anche se tale tecnica ha conosciuto negli ultimi anni grande diffusione. Attualmente viene riservata ai casi dubbi per la valutazione del torace. E' dotata di sensibilità decisamente maggiore rispetto allo studio RX riuscendo ad evidenziare anche minime differenze di densità tra i tessuti di un organo. Anche la specificità è maggiore rispetto alla radiografia convenzionale permettendo di distinguere con maggiore semplicità lesioni infiammatorie da lesioni neoplastiche.

Anche in corso di TC è possibile e consigliabile eseguire prelievi cito-biottici guidati. Essendo un esame che, a differenza dei precedenti, deve essere eseguito necessariamente in sedazione per ottenere la completa immobilità ed il corretto posizionamento del soggetto, è buona prassi privilegiare la scelta di prelievi biottici rispetto ai citologici.

2.3.5 FATTORI PROGNOSTICI LEGATI ALLO STADIO TNM

Si tratta di una stadiazione di tipo clinico basata sulla classificazione dell'estensione tumorale a seconda della valutazione del tumore primitivo (T), della presenza o assenza di interessamento del distretto linfonodale regionale (N), e l'eventuale presenza di metastasi a distanza della neoplasia (M). La standardizzazione di tale sistema è avvenuta ad opera dell' Union International Centre Cancer (UICC) in Medicina Umana. Tale classificazione è basata sulla constatazione che pazienti con malattia neoplastica estesa avevano un decorso clinico peggiore di quelli con malattia neoplastica meno estesa. I criteri su cui è fondata quindi la classificazione TNM sono sostanzialmente criteri di tipo dimensionale per quanto riguarda la definizione del parametro T, cioè un T di numero superiore è indicativo di una prognosi peggiore. Per quanto concerne il parametro N i numeri maggiori indicano gradi crescenti di interessamento di linfonodi regionali, mentre l'indice x in pedice, in qualsiasi delle classi, indica dati non sufficienti all'acquisizione del valore della singola classe. Infine la categoria M è relativa alla

localizzazione metastatica a distanza e può essere ulteriormente precisata da sigle riportanti la sede della localizzazione stessa.

Esistono alcune osservazioni da precisare in relazione all'applicazione del sistema TNM:

- il TNM deve essere utilizzato solo nel caso di neoplasie con istologia confermata
- una volta assegnate al dato paziente le categorie TNM non sono modificabili per eventuale progressione del tumore o regressione in caso di efficacia del trattamento
- la classificazione TNM può essere fatta pre-trattamento ed essere quindi definita come c-TNM (stadiazione clinica), oppure può essere una stadiazione post-chirurgica cioè istopatologia che viene definita p-TNM
- nel caso di tumori simultanei multipli dello stesso organo la classificazione è definita dallo stadio T del tumore più esteso.
- in base a tale classificazione è possibile inquadrare il paziente in alcune categorie definendone quindi degli stadi
- nel caso delle recidive neoplastiche la definizione della categoria TNM è preceduta dal simbolo "r"
- ultimamente è stato introdotto il concetto di *livello di certezza (C factor)* o livello di confidenza:

Tale livello definisce la possibilità che, in base alle informazioni utilizzabili, un paziente possa avere una diversa collocazione rispetto ad un altro, pur avendo lo stesso stadio TNM. Esistono 5 livelli di certezza:

- C1: quando per la diagnosi siano utilizzate solo metodiche standard (identificanti i requisiti minimi per definire lo stato TNM, ad esempio esame obiettivo, radiografie standard, ecografie, esami comunque di primo livello)
- C2: è il TNM utilizzante esami diagnostici di secondo livello (come ad esempio TC, RM, PET)
- C3: è il TNM ottenuto dopo chirurgia (esami istologici e metodiche diagnostiche intraoperatorie)
- C4: corrisponde come livello qualitativo al p-TNM
- C5: in cui sono utilizzati i dati relativi alla necropsia

Ai diversi livelli di confidenza corrispondono evidentemente diversi livelli di accuratezza nelle capacità predittive della stadiazione stessa.

Si rende comunque evidente il fatto che è sempre possibile e quindi auspicabile la classificazione del paziente neoplastico in uno stadio TNM.

La classificazione TNM clinica (p-TNM) è di basilare importanza nella scelta delle opzioni terapeutiche mentre la classificazione TNM patologica (p-TNM) ha un significato prevalentemente prognostico anche se può risultare estremamente utile negli indirizzi terapeutici adiuvanti.

Il grosso limite di tale sistema classificativo è il fatto che viene esclusa dalla considerazione la condizione di partenza del paziente vale a dire età, stato nutrizionale, eventuali patologie associate oltre ad altri parametri importanti relativi alla neof ormazione quali per esempio il tempo di insorgenza e lo stato della cute sovrastante la neoplasia, le dimensioni etc.

La Medicina Veterinaria ha tratto, come spesso accade, ispirazione da quanto attuato in medicina umano cercando di adattare le linee guida proposte alle proprie esigenze.

Anche in Medicina Veterinaria si è diffuso l'utilizzo della classificazione TNM nell'approccio al paziente oncologico (classificazione proposta dal World Health Organization e modificata da Owen nel 1980). In Medicina Veterinaria si considera la

patologia fondamentale da un punto di vista clinico eseguendo così il c-TNM della Medicina umana.

La stadi azione TNM permettere uno scambio di informazioni tra i medici mediante un “linguaggio standardizzato” ed aiuta l’oncologo clinico a pianificare la terapia più adatta fornendo anche un’indicazione prognostica. Per tali valutazioni il clinico deve ovviamente integrare le informazioni acquisite con i dati forniti dal patologo (istotipo, immunoistochimica etc.) anche se ad oggi in Medicina Veterinaria non esiste un p-TNM.

Ogni tipo di neoplasia ha la sua particolare classificazione TNM basata sulle proprie peculiari caratteristiche.

La **CLASSIFICAZIONE TNM (c) PER LE NEOPLASIE MAMMARIE DELLA CAGNA** è la seguente:

T *tumore primitivo*

- ❖ **T₁**: diametro massimo del tumore < 3 cm
- ❖ **T₂**: diametro compreso tra 3 e 5 cm
- ❖ **T₃**: diametro > 5 cm

La misurazione deve essere eseguita mediante un calibro ed in caso di lesioni multiple va considerata quella di dimensioni maggiori.

Può capitare di non riuscire ad identificare il tumore primario ma soltanto l’interessamento linfonodale o metastatico a distanza. Si indica quindi con **T₀** la non identificazione del primario che ha dato origine ai processi metastatici. Tale eventualità non è così remota in corso di neoplasie particolarmente aggressive come ad esempio i melanomi nel caso delle neoplasie mammarie la non identificazione del primario rappresenterebbe evento davvero eccezionale essendo le dimensioni un fattore prognostico con l’aggressività della neoplasia che generalmente va di pari passo con esse.

N *linfonodi regionali*

(ascellari, sternali craniali, inguinali superficiali, iliaci mediali)

- ❖ **N₀**: LNF istologicamente non coinvolti
- ❖ **N₁**: LNF istologicamente coinvolti

La valutazione di N rappresenta in Medicina Veterinaria il punto più critico nell’accuratezza della stadiazione clinica TNM per le difficoltà diagnostiche che incontriamo nella pratica.

M *metastasi a distanza*

- ❖ **M₀**: nessuna evidenza di metastasi a distanza
- ❖ **M₁**: metastasi presenti

Le informazioni raccolte permettono di porre il paziente in uno dei seguenti stadi clinici:

T₁N₀M₀ : STADIO I
T₂N₀M₀ : STADIO II
T₃N₀M₀ : STADIO III
T_{0,1}N₁M₀ : STADIO IV
T_{0,1}N_{0,1}M₁ : STADIO V

I progressi tecnologici apportati indagini di diagnostica per hanno notevolmente migliorato l’accuratezza della stadiazione clinica TNM.

In Medicina Veterinaria solitamente si ottiene un grado di confidenza C1 poichè difficilmente si ricorre ad esami diagnostici di secondo livello che ci permetterebbero di

avere un grado di confidenza maggiore. Inoltre non sempre riusciamo a valutare adeguatamente l'interessamento linfonodale (N). Spesso di fronte ad una palpazione clinica negativa ci fermiamo in quanto la citologia presenta, come già specificato in precedenza, comunque notevoli limiti e l'esame bioptico risulta spesso troppo invasivo comportando l'esecuzione di linfadenectomia su linfonodi che se non aumentati di volume sono difficilmente raggiungibili. Inoltre in Medicina Veterinaria non sono ancora utilizzate tecniche che permettano di individuare con certezza la via linfatica effettivamente tributaria della neoplasia. Si tratta di un limite molto importante nell'accuratezza della stadi azione TNM considerando il fatto che la prognosi peggiora notevolmente tra il III e il IV stadio essendo questo il passaggio tra malattia d'organo e malattia sistemica.

Infatti negli stadi I-II-III la patologia neoplastica è ancora "patologia d'organo" mentre negli stadi IV e V diventa "patologia sistemica".

I notevoli progressi ottenuti negli ultimi anni nell'ambito della Oncologia Veterinaria hanno, secondo alcuni autori, reso insufficientemente accurata l'attuale stadiazione TNM (c) soprattutto in virtù delle attuali possibilità di terapie adiuvanti chemioterapiche e radianti.

2.3.6 INFLUENZA PROGNOSTICA DELL'APPROCCIO CHIRURGICO

2.3.6.1 Tecnica chirurgica

Esistono diverse opinioni in merito alla tecnica chirurgica migliore in termini di emissione prognostica. In realtà non è presente ad oggi in letteratura uno studio che possa dirsi davvero conclusivo in merito alla tecnica chirurgica più opportuna.

Alcuni autori suggeriscono di rimuovere tutta la fila mammaria e quindi tutti i tumori evidenti od occulti, riducendo il rischio di recidive future; altri, invece, sostengono che la chirurgia radicale non è giustificata perché aumenta la morbilità, la durata dell'intervento e la spesa, senza prolungare effettivamente la sopravvivenza (Marconato e Del Piero, 2005). Romanelli, in parziale accordo con entrambe le opinioni, afferma che il tipo di trattamento chirurgico non ha influenza sulla prognosi ma solo sulla recidiva (Romanelli, 2007). Gli autori non hanno valutato però l'influenza della tecnica chirurgica sull'eventuale comparsa di nuove neoplasie, soffermandosi solamente sull'evento recidiva e sul tempo di sopravvivenza post-chirurgica.

Ogni tecnica chirurgica comporta vantaggi e svantaggi:

- ❖ **Nodulectomia**: Se non si conosce con certezza l'istotipo benigno questa tecnica deve essere considerata una escissione bioptica ed è comunque da utilizzarsi solo quando la massa è piccola, con un diametro minore di 5 mm, incapsulata, non adesa. È un intervento abbastanza rapido eseguibile anche con anestesia locale e la scarsa invasività dello stesso comporta tempi di recupero più rapidi, minor dolore e rare complicazioni post-chirurgiche. Se all'esame istopatologico la lesione risulta essere di natura benigna la procedura può considerarsi terapeutica, in caso contrario deve essere eseguito un intervento più invasivo.

Lo svantaggio risiede quindi in quest'ultima possibilità, in quanto il paziente viene sottoposto a due interventi con un impegno emotivo ed economico maggiore da parte del proprietario. Se inoltre, a causa dell'indole del soggetto o per ragioni organizzative si opta per una

anestesia generale si provoca un maggiore stress che può influire sui tempi di recupero.

- ❖ **Mastectomia regionale**: implica l'escissione della mammella interessata e di quelle adiacenti. Per decidere l'estensione della chirurgia è molto importante tenere conto del drenaggio linfatico, come specificato nel capitolo precedente tenendo presenti i limiti delle considerazioni che possiamo fare riguardo allo stato attuale delle conoscenze e delle opportunità diagnostiche .
- ❖ **Mastectomia totale monolaterale**: consiste nell'exeresi di tutte le ghiandole mammarie di uno stesso lato. Vi si ricorre nel caso siano presenti masse multiple lungo tutta la fila mammaria o anche singole localizzate su A1 o comunque masse di grandi dimensioni. È un intervento più invasivo e comporta tempi chirurgici di durata maggiore.
- ❖ **Mastectomia bilaterale**: exeresi di mammelle da entrambe le file. Sono possibili diverse combinazioni fino alla totale bilaterale che comporta asportazione di tutte le mammelle. La si pratica nel caso in cui la localizzazione topografica delle lesioni ne dia indicazione. Tale tecnica è quella con più frequenti complicazioni postoperatorie e sarà il chirurgo caso per caso a decidere, in base alle condizioni generali del soggetto ed alla gravità della situazione oncologica se sia più opportuno affrontare le complicazioni di cicatrizzazione postchirurgica piuttosto che due distinti interventi.

2.3.6.2 Complicazioni postchirurgiche

Eventuali complicazioni che possono insorgere nell'immediato periodo post chirurgico non hanno influenza diretta sulla patologia neoplastica ma possono incidere sulle condizioni generali del paziente e quindi influenzare eventuali scelte relative a terapie adiuvanti.

Per tale ragione ne facciamo accenno in questa sede.

1. **Reazione infiammatoria** intensa causata dal materiale da sutura (soprattutto se filo intrecciato) che interferisce con la guarigione fino a dare origine a granulomi, ovvero processi infiammatori cronici. Il rilascio di enzimi designati a degradare il corpo estraneo distrugge la matrice della ferita, prolunga la fase infiammatoria e quella fibroblastica della riparazione tissutale (Fossum, 2007).

L'utilizzo di fili riassorbibili che vengono degradati per idrolisi riduce il rischio di processi infiammatori importanti. Altre cause di infiammazione possono essere l'autotraumatismo o il leccamento a livello della ferita. Il protrarsi dell'infiammazione ritarda il processo di cicatrizzazione dei tessuti e può essere necessario somministrare degli antiinfiammatori.

2. **Ipotermia** dovuta all'esposizione di ampie aree prive di cute. Il fenomeno è tanto più accentuato quanto maggiore è la quantità di tessuto asportato e quanto è minore il rapporto tra massa corporea e superficie infatti il problema è maggiormente sentito dai soggetti di piccola taglia. Un abbassamento della temperatura corporea più marcato di solito si ripercuote anche nell'immediato periodo post-operatorio, in quanto il soggetto ha bisogno di più tempo per riportare la temperatura a livelli fisiologici: in questo caso si interviene posizionando il paziente sotto una lampada ad infrarossi ed eventualmente aiutandosi con coperte termiche e guanti pieni di acqua calda.

3. **Dolore**: la mastectomia è in generale un intervento piuttosto doloroso. E' fondamentale impostare una terapia analgesica preferibilmente con oppioidi (metadone 0,3 mg/Kg) sia durante la chirurgia che nei primi giorni postchirurgia. Il controllo del dolore è fondamentale non solo per il benessere del soggetto ma anche per l'outcome

dell'intervento. In caso di dolore infatti vengono liberati tutta una serie di mediatori (cortisolo, intereuchine etc.) che provocano un abbassamento delle difese immunitarie e ritardo nel processo di cicatrizzazione esponendo quindi il soggetto al rischio di altre complicazioni.

4. **Emorragie** che possono conseguire alla resezione accidentale dei grossi vasi tributari della mammella (toraciche, epigastrica e pudenda). Generalmente il controllo di tali emorragie è semplice poiché l'origine è evidente e facilmente raggiungibile. Le conseguenze possono invece essere molto più gravi, fino alla morte del soggetto, se sanguinamenti da tali vasi insorgono nel periodo postoperatorio quando la cute è già stata suturata e possono quindi non essere individuati da un occhio non attento.

5. **Infezione** della ferita causata da contaminazione batterica. Tale complicazione può essere conseguente ad un mancato rispetto dell'asepsi durante la chirurgia oppure per una gestione non idonea nel periodo postoperatorio (leccamento della ferita da parte del cane/ambiente inadeguato). Per tali ragioni è sempre opportuna la somministrazione postchirurgica di antibiotici ad ampio spettro e pulizia locale con amuchina diluita o altri disinfettanti che non ritardino la cicatrizzazione. E' inoltre opportuno applicare al cane il collare elisabettiano o una maglietta per evitare auto contaminazioni.

Ricordiamo comunque che a prescindere dall'ambiente e dalla gestione postoperatoria il rischio di infezione aumenta proporzionalmente con la durata dell'intervento chirurgico.

6. **Edema** a livello della ferita per il trauma chirurgico e per reazione al filo. Di maggiore importanza è quello che si può riscontrare a livello di uno o entrambi gli arti posteriori. L'asportazione delle mammelle inguinali infatti comporta l'interruzione temporanea del drenaggio linfatico, poiché vengono asportati anche i vasi linfatici e i linfonodi inguinali. Solitamente il problema si risolve in pochi giorni con attività fisica moderata che favorisce l'"effetto pompa" e/o con la somministrazione di diuretici (furosemide 1 mg/Kg BID).

7. **Raccolte ematiche** causate dallo stillicidio di sangue dei piccoli vasi e capillari sanguigni del sottocute. Il sangue si raccoglie negli spazi morti che si creano dopo l'intervento, nonostante una buona sutura della fascia mammaria, soprattutto a livello inguinale. Queste microemorragie possono

insorgere nonostante una buona emostasi intraoperatoria e possono dipendere molto dalla efficienza coagulativa del soggetto. Altra causa può essere la mancata tenuta della sutura della fascia mammaria e aumento dello spazio morto. Di solito le piccole raccolte sono autolimitanti, si organizzano e si riassorbono, mentre per quelle più grosse può essere necessario il drenaggio per qualche giorno, ma ciò aumenta il rischio di infezione e non tutti gli autori sono concordi sull'opportunità del suo utilizzo.

L'utilizzo di spugnette emostatiche posizionate a colmare lo spazio morto può contenere questo tipo di fenomeni.

8. **Sieromi** causati dal gemizio sieroso delle venule sottocutanee per vasodilatazione ed aumento della permeabilità durante l'iniziale fase infiammatoria della ferita. Agisce in concorso un ridotto drenaggio linfatico dovuto all'asportazione o comunque al danneggiamento, durante la mastectomia, dei vasi linfatici e dei linfonodi. Infatti la formazione del sieroma è più comune nella regione inguinale. Anche i sieromi più piccoli tendono a riassorbirsi mentre quelli di grosse dimensioni possono essere drenati per agoaspirazione.

Anche la formazione di sieromi così come quella di raccolte ematiche può essere contenuta colmando lo spazio morto a livello inguinale con spugnette emostatiche in collagene bovino.

9. **Necrosi** ischemica cutanea causata da eccessiva tensione della sutura o per l'applicazione di punti di sutura troppo stretti che strozzano i vasi cutanei riducendo o eliminando l'apporto di ossigeno e substrati metabolici alle cellule. In generale la sutura

cutanea in corso di mastectomia presenta sempre un certo livello di tensione che però può aumentare considerevolmente in presenza di tumori estesi con asportazione di un'ampia porzione di cute soprattutto a livello della regione toracica dove la cute è meno mobile e continuamente stirata dal movimento delle coste durante la respirazione e in conseguenza di una sutura della fascia mammaria non ben eseguita. Tale complicazione si presenta prevalentemente in corso di mastectomie bilaterali essendo abbastanza frequente il rilievo di un'area di necrosi nel punto di intersezione delle suture proprio a causa della eccessiva tensione che si crea a questo livello.

In linea generale possiamo affermare che una maggior estensione dell'intervento provoca anche un aumento delle probabilità che si verifichino delle complicazioni post-operatorie, quali infiammazione, edema, necrosi ischemica a livello cutaneo e formazione di raccolte ematiche o sieromi a causa del notevole spazio morto che rimane, come già specificato precedentemente.

2.3.6.3 Metastasectomia

In caso di metastasi in alcuni casi la prognosi può essere migliorata dall'asportazione delle prognosi. Tale procedura chirurgica è prettamente palliativa e consiste nell'asportazione delle metastasi allo scopo di migliorare la qualità di vita, l'aspettativa in termini di sopravvivenza ed anche di ridurre la massa neoplastica totale al fine di ottimizzare i risultati di eventuali protocolli chemioterapici.

E' fondamentale ricordare che tale procedura chirurgica a livello polmonare può essere oggettivamente utile per i suddetti fini soltanto in un numero selezionato di casi.

I criteri di selezione dei soggetti candidati a metastasectomia sono i seguenti:

- ❖ Almeno 300 giorni di assenza di malattia macroscopica
- ❖ Meno di tre noduli diagnosticabili (RX-TC)
- ❖ Tempo di raddoppiamento del diametro delle metastasi superiore a 30 giorni

2.3.7 PROGnosi IN RELAZIONE ALL'INTERVENTO DI OVARIECTOMIA

Gli estrogeni ed il progesterone sono ormoni fondamentali per lo sviluppo della ghiandola mammaria.

In particolare gli **estrogeni** stimolano la crescita ghiandolare, soprattutto con un'azione a carico dei dotti galattofori. Tale stimolazione è più accentuata durante la fase di proestro del ciclo estrale nella quale le concentrazioni ematiche di estradiolo sono più elevate.

I recettori per gli estrogeni sono normalmente presenti nel tessuto mammario sano della cagna.

In uno studio condotto da Millanta e al. non sono state rilevate differenze significative in termini di quantità di recettori per gli estrogeni presenti tra tessuto normale, displastico, lesioni benigne e in situ, mentre l'espressione recettoriale nei carcinomi invasivi è significativamente più bassa (Millanta et al., 2005). Durante la progressione maligna del tumore si ha perdita della dipendenza steroidea. L'espressione dei recettori ER diminuisce significativamente con l'ulcerazione cutanea, con la presenza di metastasi linfonodali, con l'età della cagna al momento della diagnosi, con lo stadio clinico avanzato, con il grado istologico elevato e con la malignità istologica del tumore (Nieto et al., 2000).

Gli estrogeni hanno un effetto proliferativo sull'epitelio caratterizzato dall'aumento dell'indice mitotico che può favorire la trasformazione maligna delle cellule. Infatti sono considerati i promotori dell'iniziazione tumorale determinando il reclutamento di cellule dormienti nel ciclo cellulare. Inoltre essi continuano nel tempo a stimolare il tumore mammario favorendone la progressione (Prall et al., 1998)

Anche i recettori per il **progesterone** sono normalmente presenti nel tessuto mammario sano della cagna.

Il progesterone ha un'azione anabolizzante, soprattutto a carico della parte alveolare, complementare a quella degli estrogeni. Durante la fase luteinica del ciclo estrale che può durare fino a 90 giorni, le componenti alveolari del tessuto mammario sono stimolate a lungo dal rilascio endogeno di questo ormone.

Inoltre nel cane il progesterone ha un'emivita molto lunga, circa 10 volte maggiore rispetto alla durata che ha nella donna. Viene quindi eliminato lentamente rimanendo in circolo per un tempo superiore (Marcato e Sarli, 2002).

A differenza degli estrogeni, l'espressione recettoriale per il progesterone è risultata più bassa sia nelle lesioni benigne che in quelle maligne, rispetto al tessuto mammario sano della cagna (Millanta et al., 2005). Una sua diminuzione non è quindi rilevante ai fini prognostici.

Bisogna però ricordare che l'importanza del ruolo del progesterone nella cancerogenesi è supportata anche dall'evidenza che l'utilizzo protratto di progestinici per prevenire l'estro può favorire l'insorgenza di iperplasia mammaria che evolve la maggior parte delle volte in una neoplasia mammaria benigna (Rutteman, 1992).

A livello delle cellule degli alveoli mammari la prolattina svolge azione trofica ed attiva la trascrizione genica per la sintesi delle proteine del latte. L'aumento dei livelli ematici di prolattina, solitamente osservato durante la seconda metà della gravidanza, favorisce lo sviluppo ulteriore del sistema acino-duttale della ghiandola mammaria in preparazione della imminente lattazione. Il progesterone inibisce la secrezione di prolattina attraverso un feedback negativo.

Uno studio recente evidenzia un prolungamento della sopravvivenza nelle cagne castrate entro 2 anni dalla mastectomia, rispetto a quelle intere o ovariectomizzate da più di due anni dalla mastectomia (Sorenmo et al., 2000).

Tale risultato contrasta con la grande maggioranza della letteratura presente sull'argomento la quale è pressoché unanime nello stabilire che l'ovariectomia eseguita dopo il secondo ciclo estrale non comporta alcun beneficio nella prevenzione dei tumori mammari. In particolare, il rischio di tumori mammari maligni in cagne ovariectomizzate entro il primo calore è ridotto allo 0,05%, dopo il primo calore è ridotto all'8% ed al 26% se l'ovariectomia avviene dopo il secondo calore ma comunque entro il quarto (Schneider et al., 1969). Dati più recenti riportano una riduzione del rischio di tumori mammari dell'80% in caso di ovariectomia effettuata prima del primo calore, del 40% tra il primo e secondo calore, mentre oltre il secondo calore non vi è più riduzione del rischio (Marconato e Del Piero, 2005). Per valutazioni approfondite in merito a tale aspetto si rimanda al *paragrafo 2.2.2* di questo stesso capitolo (*assetto ormonale endogeno*).

Secondo alcuni autori l'ambiente endocrino dell'ospite sembra influenzare l'espressione recettoriale della neoplasia. Un ambiente povero di estrogeni, come nel caso di una cagna ovariectomizzata, favorisce una neoplasia ER-, mentre un ambiente ricco di estrogeni, rilevabile in una cagna adulta intera, favorisce una neoplasia ER+ (Sorenmo et al., 2000). In base a tal principio un lungo intervallo tra l'ovariectomia e la comparsa della neoplasia può selezionare una neoplasia ER-, tendenzialmente maligna e non rispondente alla terapia ormonale.

Quindi l'ovariectomia eseguita in età adulta ma non nei 2 anni precedenti la comparsa della neoplasia potrebbe essere un fattore prognostico negativo (Marconato e Del Piero, 2005).

Tali conclusioni sono però oggetto di dibattito e le argomentazioni a sostegno di tali ipotesi non sono sufficientemente supportate da dati clinici. Per esempio non è specificata la percentuale di insorgenza di neoplasie benigne in tale popolazione. Una ipotesi potrebbe essere che l'ovariectomia in età adulta potrebbe portare ad una selezione negativa nei confronti delle neoplasie benigne e delle lesioni non neoplastiche più che una selezione positiva nei confronti delle neoplasie maligne.

Da questo si deduce nuovamente l'importanza dell'anamnesi: non basta sapere se il soggetto è stato ovariectomizzato, bisogna risalire al periodo in cui è avvenuto l'intervento.

Nonostante la vasta letteratura disponibile sull'argomento su un numero veramente ampio di casi non esiste ancora un'opinione unanime sull'utilità dell'ovariectomia in corso di mastectomia.

Secondo la gran parte degli autori l'ovariectomia eseguita in contemporanea alla mastectomia in soggetti adulti affetti da carcinoma mammario non apporta alcun beneficio in termini di sopravvivenza (Schneider R. et al, 1969; Yamagami T. et al, 1996; Morris J.S. et al, 1998; Gobello C. e Corrada Y., 2001). Morris inoltre ha rilevato che l'ovariectomia non ha un significativo effetto sulla progressione della patologia e non riduce lo sviluppo di metastasi a distanza (Morris et al., 1998). Questo dato non sorprende data la frequente assenza di recettori ormonali nelle metastasi da carcinoma mammario.

Un recente studio retrospettivo riporta che cani sottoposti ad ovariectomia in concomitanza alla mastectomia hanno una aspettativa di vita significativamente più lunga rispetto ai soggetti trattati con la sola mastectomia. Sorenmo ha infatti rilevato un aumento del tempo di sopravvivenza pari al 45% nei cani ovariectomizzati in concomitanza o nei 2 anni precedenti alla mastectomia. (Sorenmo et al., 2000).

Altri Autori hanno analizzato altri aspetti oltre al tempo di sopravvivenza, come l'insorgenza di nuove neoplasie o la comparsa di patologie ginecologiche.

Numerosi Autori, pur con motivazioni diverse, suggeriscono di effettuare l'intervento di ovariectomia ai soggetti affetti da neoplasie mammarie.

Tra questi Rutteman e Midsorp sostengono che l'ovariectomia durante la chirurgia mammaria dovrebbe essere considerata nelle cagne giovani, non tanto per prevenire la crescita metastatica ma per ridurre il successivo sviluppo di nuovi tumori benigni nel tessuto mammario rimasto (Rutteman e Midsorp, 2003).

Marconato e Del Piero, in accordo con la gran parte degli Autori sul fatto che l'ovariectomia non prolunghi la sopravvivenza dell'animale, consigliano comunque l'intervento perché promuove la regressione del tessuto mammario residuo e comunque previene altri problemi ginecologici cui frequentemente vanno incontro le cagne adulte o anziane (Marconato e Del Piero, 2005).

Secondo Sorenmo l'ovariectomia dovrebbe essere considerata nelle cagne intere con tumori epiteliali maligni. Molti di questi tumori sono ER+, in accordo con precedenti studi, e l'ovariectomia può avere altri potenziali benefici sulla salute di cagne anziane (Sorenmo, 2003).

E' evidente come i suddetti studi prendano in considerazione solo pochi degli aspetti da considerare per una accurata emissione prognostica. Non si trovano infatti in letteratura lavori che correlino l'esecuzione di ovariectomia in corso di mastectomia con gli eventi: tempo libero da malattia, insorgenza di nuova neoplasia maligna, insorgenza di recidiva e diffusione metastatica.

Gli studi presenti prendono in esclusiva considerazione il tempo di sopravvivenza.

2.3.7 INFLUENZA PROGNOSTICA DI RADIO E CHEMIOTERAPIA

La chemioterapia antitumorale in Medicina Veterinaria prevede l'utilizzo di farmaci citostatici e/o citotossici amministrati in regimi monochemioterapici e polichemioterapici combinati o sequenziali e può essere utilizzata da sola o in strategie combinate comprendenti chirurgia e/o radioterapia.

Le indicazioni per la chemioterapia in generale sono escissione chirurgica incompleta, evidenza istologica d'invasione linfatica, presenza di metastasi (linfonodali, polmonari, ossee o viscerali), recidiva locale e tipo istologico aggressivo (carcinoma invasivo, solido, carcinosarcoma, sarcoma).

Purtroppo esistono ancora poche informazioni riguardo l'efficacia della chemioterapia per i carcinomi mammari della cagna. I protocolli disponibili prevedono l'utilizzo della doxorubicina in monochemioterapia o combinata alla ciclofosfamide e al 5-fluorouracile, della gemcitabina e della doxorubicina incapsulata in liposomi. Altri chemioterapici potenzialmente efficaci sono mitoxantrone, cisplatino e carboplatino (Marconato e Del Piero, 2005; Marconato et al, 2008).

Uno studio eseguito su 16 cagne con carcinoma mammario riporta un significativo aumento in termini di sopravvivenza nei soggetti trattati con una combinazione di 5-fluorouracile e ciclofosfamide rispetto a quelli sottoposti a sola chirurgia (Karayannopoulos, 2001).

Dato l'esiguo numero di studi e di casi non è possibile dire ad oggi se vi sia un protocollo realmente efficace e quale sia.

Così come per la chemioterapia, al momento ci sono ancora poche informazioni disponibili sulla reale efficacia della radioterapia.

La radioterapia può essere utilizzata in seguito ad un intervento chirurgico conservativo per eliminare focolai neoplastici residui e ridurre così eventuali recidive, oppure si può applicare a tumori mammari inoperabili per il controllo del dolore.

Non agendo sul potenziale metastatico, tale trattamento non aumenta la sopravvivenza del soggetto.

CAPITOLO III

PARTE SPERIMENTALE

3.1 MATERIALI E METODI

Il nostro studio è di tipo clinico e si è concentrato sull'analisi dei fattori di rischio e prognostici delle neoplasie mammarie della cagna.

In particolare i fattori di rischio e prognostici presi in considerazione nel nostro studio sono i seguenti:

- **Razza**
- **Taglia**
- **Età**
- **Regime alimentare** (commerciale – non commerciale)
- **Stato di nutrizione** (sotto – normo – sovrappeso mediante valutazione clinica BSC)
- **Ambiente** (urbano – suburbano – rurale)
- **Localizzazione topografica** della neoformazione prendendo come riferimento il capezzolo più vicino
- **Fase del ciclo al momento dell'insorgenza**
- **Localizzazione in base alla fase del ciclo al momento dell'insorgenza**
- **Anamnesi di pseudociesi**
- **Ovariectomia in corso di mastectomia**
- **Istotipo**
- **cTNM**

La popolazione selezionata per il nostro studio è costituita da cagne adulte di varie razze ed età presentatesi presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università degli studi di Pisa per patologie a carico del tessuto mammario rilevate dal proprietario stesso, dal veterinario referente oppure presso il nostro Dipartimento.

Ogni soggetto è stato sottoposto ad accurata visita clinica comprendente il segnalamento, la raccolta dei dati anamnestici, l'esame obiettivo generale e l'esame obiettivo particolare con striscio vaginale.

Al fine di ottenere una standardizzazione della visita clinica è stata approntata una scheda da compilare per i soggetti con patologia mammaria che contenesse tutti quei dati ritenuti rilevanti in base alla letteratura, o potenzialmente tali, per l'inquadramento della patologia mammaria.

3.1.1 SCHEDA MAMMARIA

- ❖ **Data della prima visita**
- ❖ **Numero di cartella**
- ❖ **Proprietario (cognome e nome)**
- ❖ **Numero di telefono**
- ❖ **Età (anni)**
- ❖ **Razza**
- ❖ **Intera vs Ovariectomizzata/Ovarioisterectomizzata**
- ❖ **Momento della castrazione rispetto al numero di cicli estrali effettuati**
 - prima del primo ciclo estrale
 - tra il primo ed il secondo ciclo estrale
 - tra il secondo ed il terzo ciclo estrale
 - tra il terzo ed il quarto ciclo estrale

- dopo il quarto ciclo estrale ma non nei due anni precedenti all'insorgenza della neoplasia
 - dopo il quarto ciclo estrale nei due anni precedenti all'insorgenza della neoplasia
- ❖ **Stato di nutrizione** basato sul peso indicato nello standard di ciascuna razza +/- 10%. Nel caso di soggetti meticci ci siamo basati sulla classificazione a cinque livelli del **BCS** (*body condition score*)

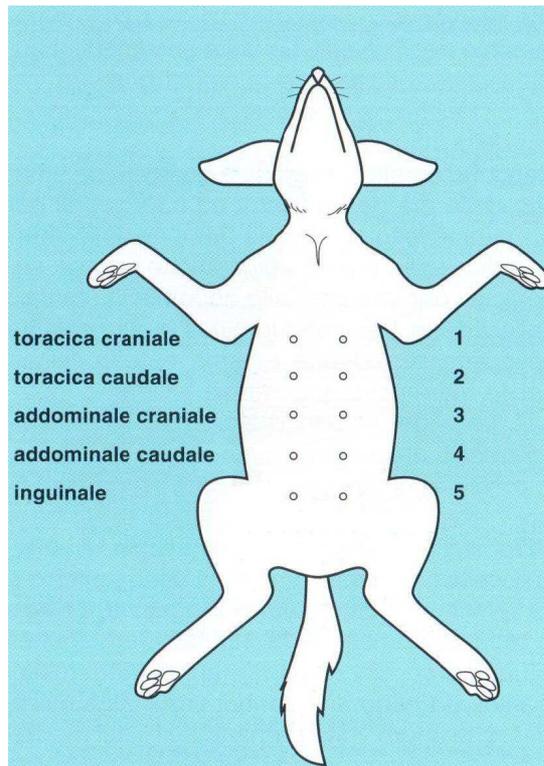


Lo score prende in considerazione l'evidenza delle prominenze ossee, l'estensione dalla piega della grassella ed il profilo dei fianchi in relazione al tipo morfologico (dolico – meso e brachimorfo) e alla razza.

GIGANTI	GRANDI	MEDIE	PICCOLE
Bracco 36-50kg Levriero scozzese 36-45kg Alano 45-55kg Levriero Irlandese 40-55kg Leonberger 34-50kg Mastino 80-86kg Terranova 50-70kg Cane da m.a dei Pirenei 40-57 kg San Bernardo 50-90kg	Levriero Afgano 23-27kg Pastore belga 28-30kg Bovaro del Bernese 40-44kg Borzoi (levriero russo) 35-48kg Bovaro delle Fiandre 27-40kg Boxer 25-32kg Pastore di Brie 30-39kg Bullmastiff 41-59kg Clumber Spaniel 29-36kg Curly-Coated Retriever 32-36kg Dalmata 23-27kg Dobermann 30-40kg Dogue de Bordeaux 45-50kg Setter Inglese 25-30kg Flat-Coated Retriever 25-36kg Pastore Tedesco 34-43kg Pointer Tedesco a pelo corto 25-32kg Pointer Ted. wire-haired 20-34kg Golden Retriever 27-36kg Levriero 27-32kg Vizsla ungherese 22-30kg Setter Irlandese 27-32kg Irish Water Spaniel 20-29kg Spinone Italiano 29-39kg Akita Inu 34-50kg Labrador 25-34kg Bobtail 30-40kg Cane da caccia alle lontre 30-55kg Barboncino (standard) 20-32kg Rhodesian Ridgeback 30-39kg Rottweiler 41-50kg Saluki 20-30kg Samoiedo 23-30kg Schnauzer (Gigante) 32-35kg Weimaraner 32-39kg	Airedale Terrier 20-23kg Cocker Americano 11-13kg Bassotto 18-27kg Bearded Collie 18-27kg Border Collie 14-20kg Bull Terrier 24-30kg Bulldog 23-25kg Chow Chow 20-32kg Cocker Spaniel 13-15kg Pastore Scozzese 18-30kg Elkhound 18-23kg Pointer Inglese 20-30kg Springer Sp. Inglese 22-25kg Volpino finlandese 14-16kg Keeshond 25-30kg Kerry Blue 15-17kg Puli (Puli ungherese) 9-18kg Schnauzer (Standard) 16-20kg Shar Pei 16-20kg Siberian Husky 16-27kg Soft-coated Wheaten T. 16-22kg Staffordshire Bull T. 11-17kg Springer Spaniel 22-24kg	Bichon Frisé 3-6kg Chihuahua 1-3kg Chinese Crested 2-5kg Bassotto nano 4-5kg Levriero italiano 3-5kg Maltese 2-3kg Papillon 2-5kg Pechinese 3-6kg Volpino tedesco 2-3kg Barboncino (nano) 3-7kg Yorkshire Terrier 2-3kg Basenji 9-11kg Beagle 8-14kg Bedlington Terrier 8-10kg Border Terrier 5-7kg Boston Terrier 5-12kg Caim Terrier 6-8kg Cavalier King Charles Sp. 5-8kg Bassotto Tedesco 9-12kg Dandie Dinmont 8-11kg Fox Terrier 7-8kg Bulldog francese 10-13kg Jack Russell Terrier 5-8kg King Charles Spaniel 4-6kg Lhasa Apso 6-7kg Norfolk/Norwich Terrier 5-6kg Barboncino (nano) 12-14kg Carlino 6-8kg Schnauzer (nano) 6-7kg Schipperke 6-8kg Terrier scozzese 8-11kg Sealyham Terrier 8-9kg Cane da pastore scozzese 6-7kg Shiba Inu 9-14kg Shih Tzu 5-7kg Skye Terrier 8-11kg Spaniel tibetano 4-7kg Terrier tibetano 8-14kg Corgi gallese 9-12kg West Highland White T. 7-10kg Whippet 10-13kg

classificando quindi i soggetti in

- Sottopeso
- Normopeso
- Sovrappeso
- ❖ **Regime alimentare**
 - Casalingo
 - Commerciale
 - Misto
- ❖ **Ambiente abituale** tale informazione è stata raccolta dal proprietario
 - Urbano
 - Suburbano
 - Rurale
- ❖ **Anamnesi di pseudociesi** considerandola positiva se all'anamnesi almeno un episodio di ipertrofia mammaria con secrezione latte
- ❖ **Precedenti trattamenti ormonali** specificando il principio attivo utilizzato, il dosaggio in ng/Kg, la durata del trattamento ed il numero totale di trattamenti somministrati
- ❖ **Numero di parti**
- ❖ **Fase del ciclo al momento della diagnosi** identificata mediante striscio vaginale con allestimento di un vetrino colorato mediante metodo Diff Quick ed osservato con microscopio ottico ad ingrandimento 40X. In questo modo abbiamo inquadrato i soggetti nelle fasi di:
 - *Proestro*
 - *Estro*
 - *Diestro*
 - *Anestro*
- ❖ **Familiarità** della patologia mammaria considerando ascendenti e discendenti in linea diretta e non e collaterali
- ❖ **Anamnesi di precedenti chirurgie mammarie**
- ❖ Tipologia di eventuali **precedenti chirurgie mammarie**
- ❖ Precedente eventuale **referto istopatologico** inerente a patologie mammarie
- ❖ **Nuova neoplasia vs Recidiva** per quei soggetti che avessero all'anamnesi precedenti chirurgie mammarie
- ❖ **Dimensione** della neoformazione in mm misurandone mediante un calibro il diametro maggiore. Nel caso di neoformazioni multiple le si appuntano tutte considerando per la stadiazione clinica quella con diametro maggiore
- ❖ **Nodulo singolo vs Noduli multipli**
- ❖ **Localizzazione** di ogni singolo nodulo in relazione alle dieci mammelle prendendo come riferimento il capezzolo più vicino. La localizzazione dei singoli noduli rispetto alle mammelle viene quindi appuntata su uno schematico disegno rappresentante la veduta ventrale del cane.
Tale valutazione viene ripetuta prima di una eventuale chirurgia dopo che si è proceduto alla tricotomia del soggetto



- ❖ **Tempo di insorgenza** in giorni. Ci si basa sul momento della rilevazione da parte nostra, da parte del proprietario o da parte del veterinario referente.
- ❖ **Stato della cute sovrastante la lesione**
 - Integra
 - Infiammata
 - Ulcerata
- ❖ **Mobilità** della lesione rispetto ai piani sottostanti
- ❖ **Linfoadenomegalia inguinale/ascellare** rilevata mediante palpazione. Nel caso di un riscontro positivo si è proceduto con l'esecuzione di un esame ecografico (Xario XG Toshiba - sonda microconvex multifrequenza 5-8 MHz) della struttura e l'eventuale esecuzione di prelievi (FNA-FNCS-biopsie).

3.1.2 RICERCA DI METASTASI (STADIAZIONE TNM)

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esami di diagnostica per immagini per la ed in particolare:

- ❖ **RX TORACE** in tre proiezioni : LL (latero laterale) dx- LL sx – VD (ventro-dorsale) eseguite con radiologico digitale (300 mA) per la valutazione del parenchima polmonare e delle stazioni linfonodali toraciche. Nel caso di immagini dubbie si è proceduto all'esecuzione di uno studio **TC** del torace riferendo i soggetti presso altre strutture dotate di tale tecnologia. Le lesioni polmonari sono state classificate secondo il seguente schema:
 - macrometastasi ($\varnothing > 5\text{mm}$) (con citologia positiva)
 - noduli multipli ($\varnothing > 3$ e < 5 mm) (con citologia positiva)
 - noduli miliari ($\varnothing < 3\text{mm}$)
 - versamento pleurico (con citologia positiva)

- ❖ **ECO ADDOME** completo eseguito con ecografo Xario XG Toshiba (sonda microconvex multifrequenza 5-8 MHz) per la ricerca di lesioni metastatiche a carico degli organi parenchimatosi addominali e delle stazioni linfonodali
- ❖ **FNA-FNCS-BIOPSIA** nei casi in cui, sia a livello toracico che addominale fossero state identificate lesioni di natura sospetta. Ago aspirazione (FNA) ed ago infissione (FNCS) sono stati generalmente eseguiti con soggetto sveglio mentre l'esecuzione dei prelievi biotici è sempre avvenuta previa sedazione e nei casi in cui FNA ed FNCS non fossero conclusivi
- ❖ **RX OSSA** nel caso di sospette metastasi ossee
- ❖ **RMN CRANIO** da eseguire in caso di sospette metastasi cerebrali (da eseguire presso altra struttura per la non disponibilità di tale tecnologia presso il nostro Dipartimento)

Una volta ottenute le suddette informazioni ciascun soggetto è stato inserito in uno dei cinque stadi della **STADIAZIONE CLINICA TNM**

3.1.3ESAMI DI LABORATORIO

Ciascun soggetto è stato quindi sottoposto ad al fine di poter delineare in maniera più accurata lo stato di salute generale ed eventuali problematiche metaboliche concomitanti anche in vista di un eventuale intervento chirurgico.

I parametri considerati sono stati i seguenti:

- *Emocromo completo con formula*
- *Proteine totali*
- *Albumina*
- *Na, K, Ca⁺⁺*
- *Calcio*
- *Fosforo*
- *Ferro*
- *Urea*
- *Creatinina*
- *Bilirubina totale*
- *Colesterolo totale*
- *Trigliceridi*
- *Glicemia*
- *ALKP*
- *GGT*
- *AST/GOT*
- *ALT/GPT*
- *CK*
- *Amilasi*
- *LDH*
- *PT (tempo protrombina)*
- *PTT (tempo tromboplastina parz.att.)*
- *Fibrinogeno coagulo metrico*

- *Esame urine completo con sedimento*
- *Proteine urinarie*

Si è anche proceduto alla conservazione di una quota di **SIERO sottoposto a congelamento a -80 °C**

3.1.4 CHIRURGIA

Per i soggetti sottoposti a chirurgia i criteri di escissione ai quali si è fatto capo si riferiscono al drenaggio linfatico fisiologico.

Abbiamo quindi fatto ricorso ad una delle seguenti opzioni:

- *Mastectomia regionale craniale (T1+T2+AI) + linfonodo ascellare se aumentato di volume in caso di lesioni a carico delle mammelle toraciche*
- *Mastectomia regionale caudale(A1+A2+I) + linfonodo inguinale sempre*
- *Mastectomia intera fila monolaterale + linfonodo inguinale sempre + linfonodo ascellare se aumentato di volume*
- *Mastectomia bilaterale* come opportuna combinazione delle sopra citate opzioni a seconda delle localizzazioni delle diverse neoplasie

Specificando se nella stessa sede chirurgica viene eventualmente eseguita anche l'**ovariectomia**

Si appuntano anche eventuali complicanze insorte nell'immediato postoperatorio. Per immediato postoperatorio si intendono i 10 giorni successivi alla chirurgia che rappresentano anche il periodo per il quale mediamente vengono lasciati i punti di sutura.

Gli eventi principalmente considerati sono:

- *Raccolta*
- *Edema*
- *Deiscenza della ferita*
- *Ritardo cicatriziale*

3.1.5 ANALISI ISTOPATOLOGICA

I tessuti asportati durante la chirurgia (mammelle + eventuali linfonodi), dopo aver accuratamente segnato ogni singola lesione con filo da sutura, sono stati fissati nella loro interezza in formalina rispettando un rapporto pezzo/formalina 1:10 ed inviati presso il Dipartimento di Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Pisa.

Il materiale viene sempre accompagnato dai dati segnaletici del paziente ed in particolare:

- *sesso (specificando se si tratta di soggetto intero o castrato)*
- *razza*
- *taglia*
- *localizzazione topografica della lesione*
- *tempo di insorgenza*

- *aspetto macroscopico in vivo (stato della cute sovrastante ed eventuale adesione ai piani sottostanti)*

In caso di lesioni multiple sono state fornite le informazioni relative ad ogni singolo nodulo.

Una volta ricevuto il referto istopatologico si è provveduto ad appuntare tutte le informazioni inerenti alla neoplasia o alle singole neoplasie in caso di lesioni multiple ed in particolare:

- Neoplastica/non neoplastica

Per le lesioni neoplastiche:

- Benigna/maligna

Per le lesioni maligne

- Mesenchimale/epiteliale

Per le lesioni epiteliali

- Semplice/complesso

Per le lesioni epiteliali semplici

- Tubulare/solido/anaplastico

- Referto istopatologico inerente alle stazioni linfonodali inviate
- Grado istologico 0-I-II-III secondo Gilbertson et al.
- Grado di differenziazione secondo Elston Ellis: WDC-MDC-PDC
- Eventuale espressione recettoriale per estrogeni-progesterone-COX-2

3.1.6 FOLLOW UP

Tutti i soggetti della popolazione sono stati sottoposti ad un per un totale di **due anni (730 giorni)** con **controlli ogni sei mesi (180 giorni)**

Ogni sei mesi ciascun soggetto è stato sottoposto a nuova visita clinica con accurata ispezione del sito di chirurgia al fine di verificare l'eventuale presenza di recidiva locale. Nei casi dubbi si è proceduto all'esecuzione di prelievi citologici e nel caso in cui questi non abbiano dato risultati conclusivi a prelievi biotici.

Abbiamo inoltre eseguito la palpazione delle mammelle eventualmente rimaste al fine di individuare l'insorgenza di nuove neoplasie e la palpazione dei linfonodi inguinali, ascellari e poplitei.

Ogni sei mesi tutti i soggetti per i quali l'esame istopatologico ha dato come esito quello di neoplasia maligna sono stati nuovamente sottoposti ad RX torace in tre proiezioni: LL (latero laterale) dx- LL sx – VD (ventro-dorsale) eseguite con radiologico digitale (300 mA) per la valutazione del parenchima polmonare e delle stazioni linfonodali toraciche.

Nel caso di immagini dubbie si è proceduto come in precedenza all'esecuzione di uno studio TC del torace riferendo i soggetti presso altre strutture dotate di tale tecnologia

Sempre ogni sei mesi è stata sempre eseguita una ecografia addominale completa eseguito con ecografo Xario XG Toshiba (sonda microconvex multifrequenza 5-8 MHz) per la ricerca di lesioni metastatiche a carico degli organi parenchimatosi addominali e delle stazioni linfonodali.

Nei casi di lesioni dubbie sia a livello toracico che addominale si è proceduto con l'esecuzione di FNA ed FNCS e qualora questi non siano stati conclusivi con l'esecuzione di prelievi biotici.

Durante i due anni di follow up gli eventi principalmente considerati sono stati:

- ❖ **Recidiva**
- ❖ **Nuova neoplasia**
- ❖ **Metastasi**
- ❖ **Morte**

Dalla popolazione così selezionata sono state estrapolate sottopopolazioni a seconda delle esigenze dei parametri in studio.

Quando l'indagine statistica lo ha richiesto abbiamo normalizzato i dati su una popolazione di controllo selezionata sempre presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università degli Studi di Pisa.

3.2 RISULTATI

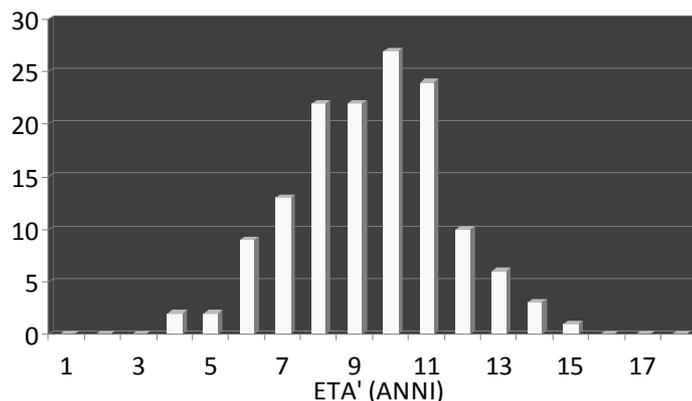
Per lo studio dei fattori di rischio anamnestici e segnaletici (razza, taglia, età, regime alimentare, stato di nutrizione, ambiente e localizzazione topografica della lesione) abbiamo considerato una popolazione costituita da 151 cagne adulte affette da neoplasie mammarie singole o multiple. I dati ottenuti sono stati quindi normalizzati su una popolazione di controllo altrettanto vasta (n: 163) costituita da cagne adulte presentate presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria per problemi non inerenti la mammella e sottoposti ad elaborazione statistica con test del χ^2 .

Per quanto concerne l'età di insorgenza i risultati sono stati i seguenti:

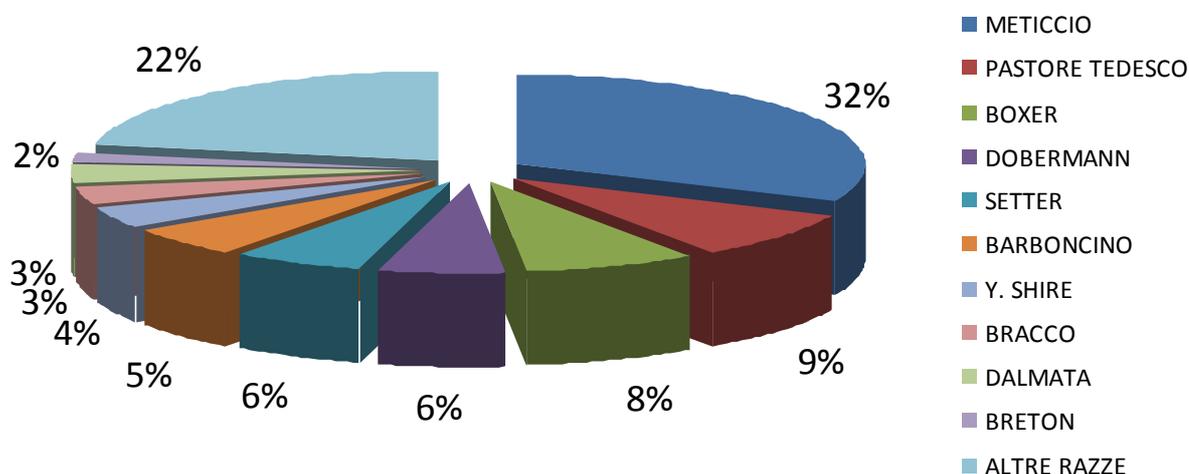
ANNI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
N. CASI	0	0	0	2	10	9	13	22	22	27	24	10	6	3	1	0	0

Troviamo il picco della casistica tra i 10 e gli 11 anni con una media di 9,4 anni, una moda di 10 anni ed una mediana di 10 anni.

Il range varia da 4 a 15 anni.



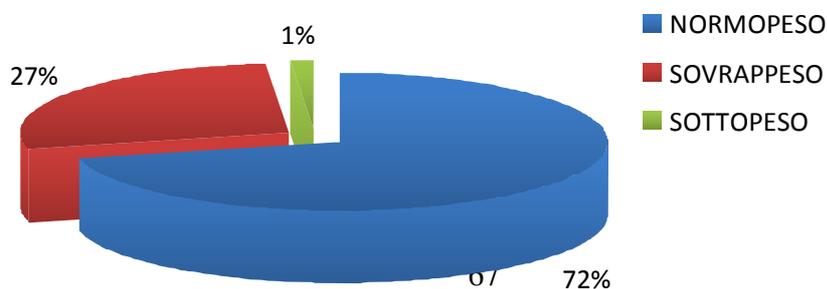
Per quanto concerne invece la predisposizione di razza la popolazione affetta da neoplasia si componeva di 33 diverse razze mentre la popolazione di controllo di 40 così distribuite:



	POPOLAZIONE CON TUMORE MAMMARIO	POPOLAZIONE DI CONTROLLO	χ^2
METICCIO	n: 48 (32%)	n: 40 (26%)	NS
PASTORE TEDESCO	n: 13 (9%)	n: 10 (6%)	NS
BOXER	n: 12 (8%)	n: 11 (7%)	NS
DOBERMANN	n: 9 (6%)	n: 5 (3%)	NS
SETTER INGLESE	n: 9 (6%)	n: 4 (3%)	NS
BARBONE NANO	n: 8 (5%)	n: 3 (2%)	NS
YORK SHIRE	n: 6 (4%)	n: 0 (0%)	P < 0,05
BRACCO TEDESCO	n: 5 (3%)	n: 0 (0%)	NS
DALMATA	n: 5 (3%)	n: 0 (0%)	P < 0,05
BRETON	n: 3 (2%)	n: 0 (0%)	NS
LABRADOR RETRIVER	n: 2 (1%)	n: 17 (11%)	P < 0,01
GOLDEN RETRIVER	n: 0 (0%)	n: 7 (4%)	P < 0,01
ROTTWAILER	n: 2 (1%)	n: 7 (4%)	NS
JACK RUSSEL TERRIER	n: 2 (1%)	n: 5 (3%)	NS
CANE CORSO	n: 1 (1%)	n: 4 (3%)	NS
PINCHER	n: 1 (1%)	n: 3 (2%)	NS
TERRANOVA	n: 0 (0%)	n: 3 (2%)	NS
CARLINO	n: 0 (0%)	n: 3 (2%)	NS
SCHITZU	n: 0 (0%)	n: 3 (2%)	NS
ALTRE RAZZE	n: 33 (22%)	n: 31 (20%)	NS

Da questi dati si evidenzia come York Shire Terrier e Dalmata presentino un rischio maggiore mentre Labrador Retriever e Golden Retriever un rischio decisamente minore di sviluppare tumore mammario.

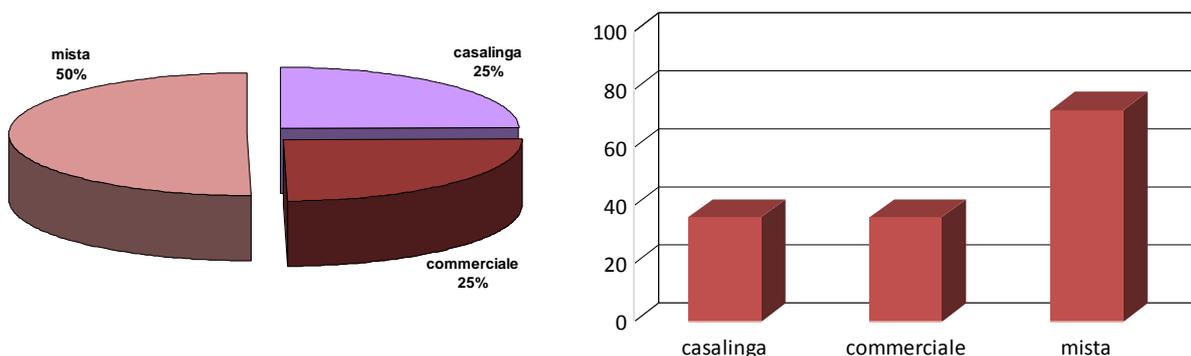
Si è quindi considerato lo stato di nutrizione dividendo i soggetti in tre categorie (sotto – normo e sovrappeso) secondo i criteri già specificati in precedenza.



	POPOLAZIONE MAMMELLA	POPOLAZIONE CONTROLLO
SOTTO-NORMOPESO	n: 106 (73%)	n: 133 (92%)
SOVRAPPESO	n: 40 (27%)	n:12 (8%)

L'elaborazione statistica di tali dati ha evidenziato come il sovrappeso sia un fattore di rischio per l'insorgenza di neoplasie mammarie con $P < 0,01$.

Si è quindi confrontato il rischio nei soggetti alimentati con dieta esclusivamente commerciale rispetto a quello dei soggetti alimentati con dieta mista o casalinga:

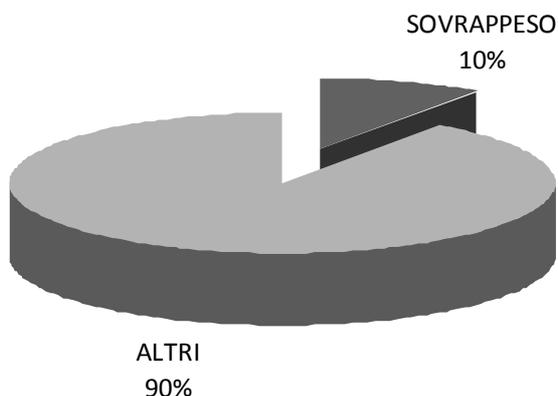


	POPOLAZIONE MAMMELLA	POPOLAZIONE CONTROLLO
ALIMENTAZIONE COMMERCIALE	n: 36 (25%)	N: 57 (59%)
ALIMENTAZIONE NON COMMERCIALE	N: 109 (75%)	N: 60 (61%)

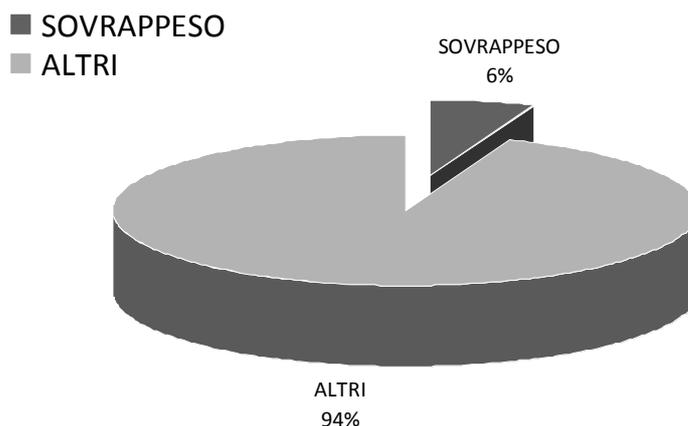
L'elaborazione statistica di questi dati evidenzia come soggetti alimentati con dieta commerciale presentino una riduzione fortemente significativa ($P < 0,01$) del rischio di sviluppo di neoformazioni mammarie.

Abbiamo quindi ritenuto interessante confrontare la percentuale dei cani sovrappeso nella popolazione alimentata con dieta commerciale con quella della popolazione alimentata con dieta non commerciale per valutare l'influenza della dieta sullo stato di nutrizione.

ALIMENTAZIONE COMMERCIALE



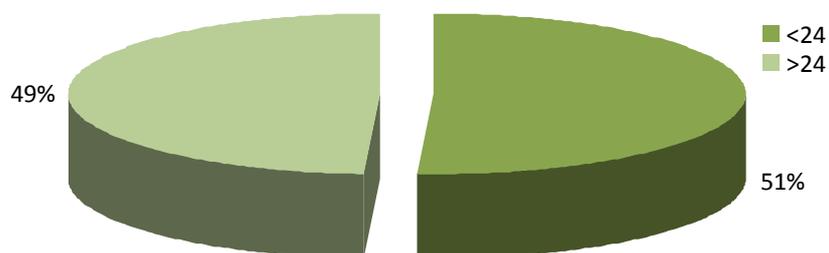
ALIMENTAZIONE NON COMMERCIALE



	SOVRAPPESO	NORMO/SOTTOPESO
ALIMENTAZIONE COMMERCIALE	n: 14 (10%)	n: 130 (90%)
ALIMENTAZIONE NON COMMERCIALE	n: 8 (6%)	n: 128 (94%)

Dai nostri dati non emerge una correlazione tra tipologia di alimentazione e stato di nutrizione.

Si è proceduto quindi alla valutazione della taglia dei soggetti calcolando la mediana dei pesi (popolazione in studio e popolazione di controllo) al fine di valutare se vi erano differenze significative nella distribuzione dei soggetti delle due popolazioni.

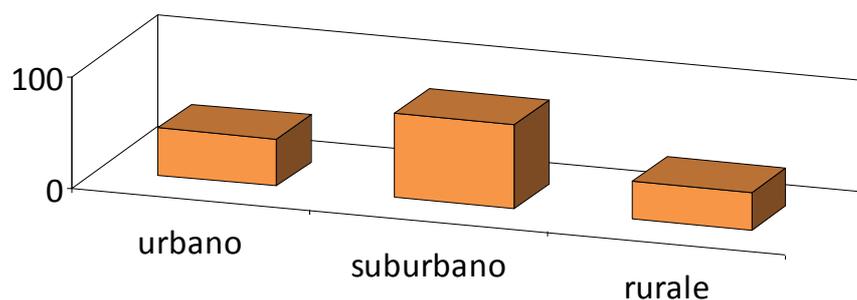


	POPOLAZIONE MAMMELLA	POPOLAZIONE CONTROLLO
<24 Kg	n: 70 (51%)	n: 64(46%)
>24 Kg	n: 68 (49%)	n: 74 (54%)

La mediana è risultata essere 24 Kg e non si sono rilevate differenze statisticamente significative (χ^2) per quanto concerne la taglia nei due gruppi.

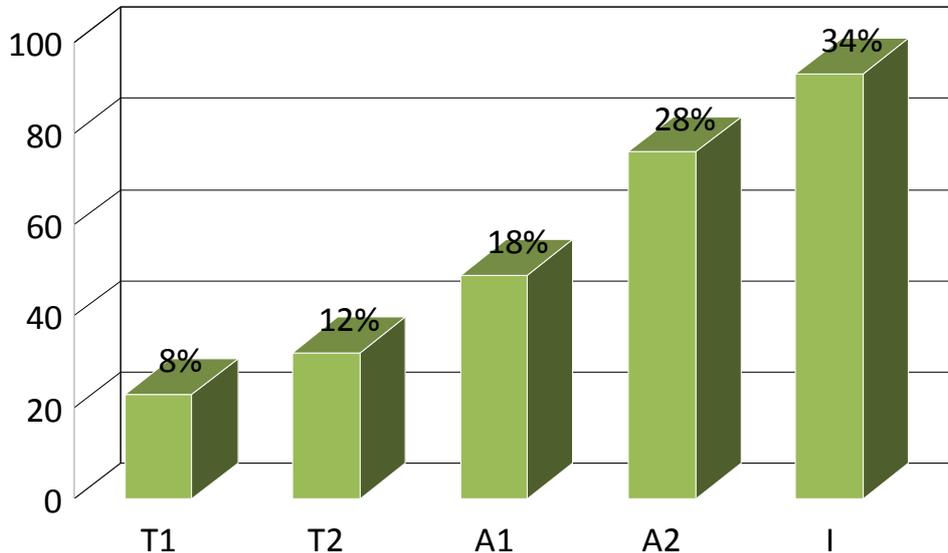
Altra variabile presa in considerazione è stata l'ambiente nel quale il cane vive con i seguenti risultati:

	POPOLAZIONE MAMMELLA	POPOLAZIONE CONTROLLO
URBANO	n: 42 (28%)	n: 66 (41%)
SUBURBANO	n: 75 (49%)	n: 50 (38%)
RURALE	n: 34 (23%)	n: 54 (23%)



Dall'elaborazione statistica di questi dati è emerso un aumento del rischio di sviluppo di neoplasia mammaria nei cani residenti in ambiente suburbano con una $P < 0,05$.

Per quanto concerne la distribuzione topografica delle neoformazioni sulle cinque mammelle prendendo come punto di riferimento il capezzolo più vicino al nodulo.



I TORACICA	II TORACICA	I ADDOMINALE	II ADDOMINALE	INGUINALE
n: 23 (8%)	n: 32 (12%)	n: 49 (18%)	N: 76 (28%)	n: 93 (34%)

Si evidenzia la progressiva diminuzione di incidenza di neoplasie mammarie procedendo dalle mammelle inguinali verso le toraciche.

Per valutare la prognosi delle neoplasie mammarie in relazione alla fase del ciclo al momento dell'insorgenza abbiamo selezionato una popolazione costituita da 31 cagne intere adulte di varie razze presentate presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università degli Studi di Pisa per la presenza di neoformazioni mammarie singole o multiple che fossero insorte da meno di un mese (rilevamento del proprietario o del veterinario curante oppure da noi in soggetti presentati per altre patologie) per poter associare sicuramente l'insorgenza ad una determinata fase.

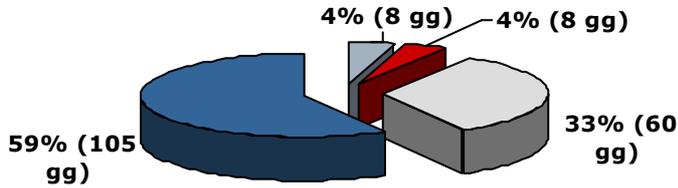
L'età dei soggetti era compresa tra 2 e 16 anni con una media di 9 anni.

In tutti i soggetti è stata eseguita una accurata visita clinica ed annotata la localizzazione delle neoformazioni rispetto alle mammelle prendendo come riferimento il capezzolo più vicino. Contestualmente si è eseguito uno striscio vaginale (colorazione Diff Quick – ingrandimento 10x e 40x) per identificare la fase del ciclo corrispondente al rilevamento della/delle neoformazione/i. È stata quindi eseguita una valutazione della distribuzione delle percentuali di insorgenza delle neoplasie mammarie nelle diverse fasi del ciclo al fine di valutare se vi fosse una maggiore incidenza in un determinato momento del ciclo.

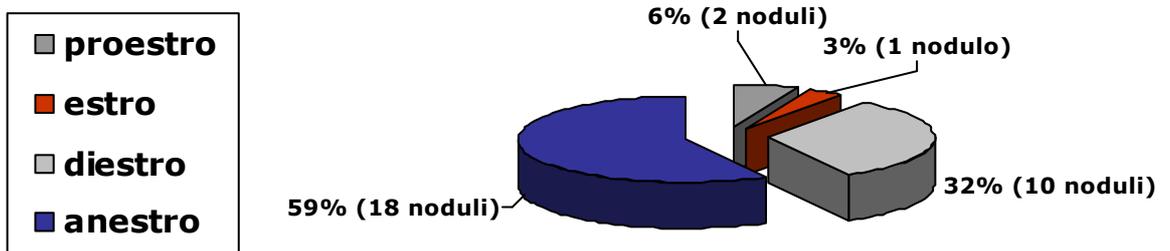
Considerando la distribuzione media delle varie fasi in un ciclo normale di sei mesi (proestro: 8 giorni – estro: 8 giorni – diestro 60 giorni – 105 giorni) e confrontandola

con la distribuzione di insorgenza delle neoformazioni mammarie della nostra popolazione rileviamo una corrispondenza quasi perfettamente sovrapponibile:

DURATA % (GIORNI)



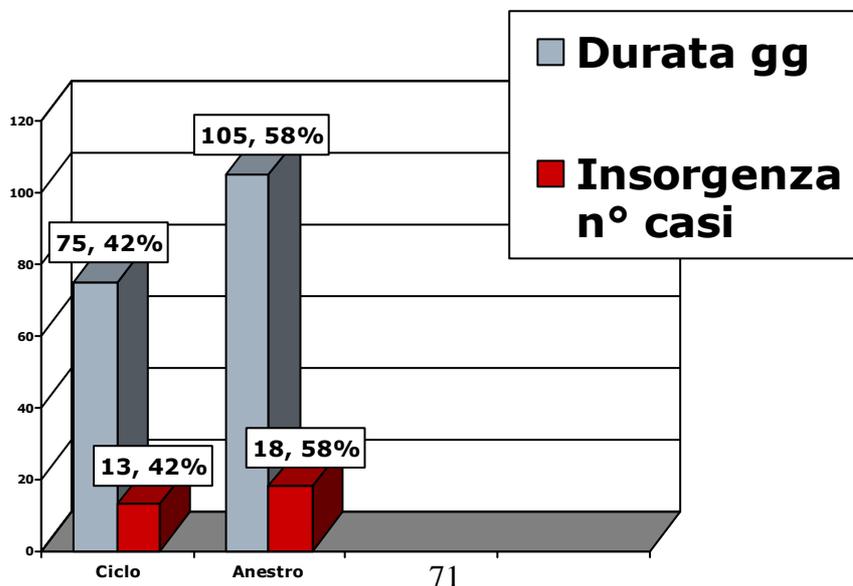
INSORGENZA % (CASI)



FASE DEL CICLO	PROESTRO	ESTRO	DIESTRO	ANESTRO
DURATA	8 giorni (4,5%)	8 giorni (4,5%)	60 giorni (33%)	105 giorni (58%)
INSORGENZA	2 (6%)	1 (3%)	10 (32%)	18 (58%)

Quindi raggruppando le diverse fasi otteniamo:

	CICLO	ANESTRO
DURATA	75 giorni (42%)	105 giorni (58%)
INSORGENZA	13 (42%)	18 (58%)

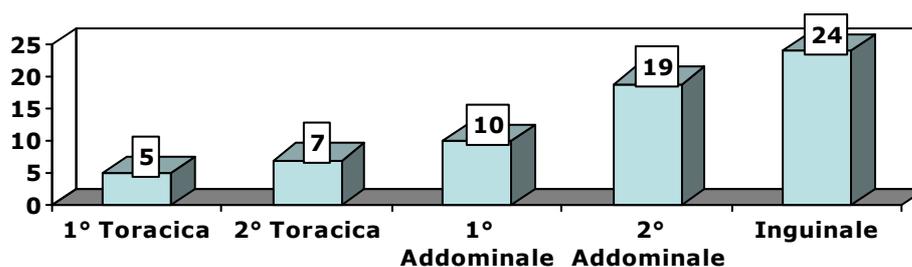


Dei 31 soggetti componenti la nostra popolazione 7 (23%) presentavano noduli singoli e 24 (77%) multipli.

In totale si sono evidenziati 65 noduli così distribuiti:

MAMMELLA	I TORACICA	II TORACICA	I ADDOMINALE	II ADDOMINALE	INGUINALE
NODULI	5 (8 %)	7 (11 %)	10 (15 %)	19 (29 %)	24 (37 %)

DISTRIBUZIONE DEI NODULI SULLE MAMMELLE

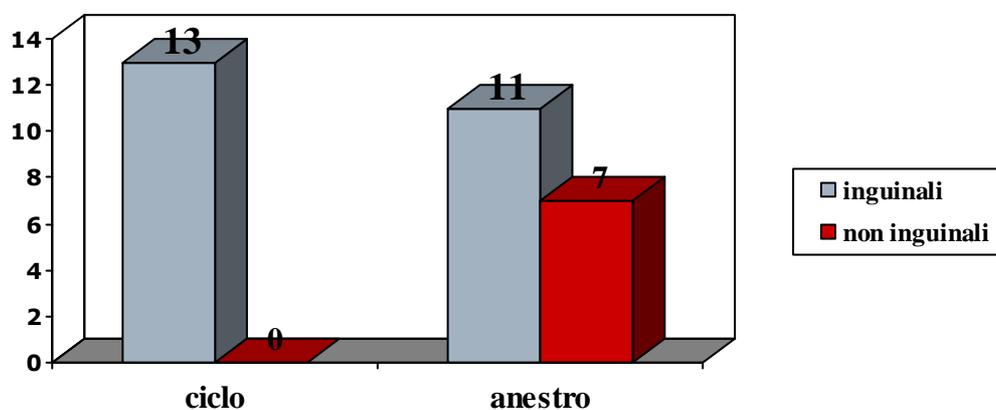


Tutte le neoplasie sono state sottoposte ad esame istopatologico. Nei soggetti con lesioni multiple si è considerato l'istotipo più maligno risultando 14 soggetti con patologia benigna (45%) e 17 con patologia maligna (55%).

Si è quindi proceduto a valutare eventuali correlazioni tra il momento di insorgenza e la localizzazione della neoplasia.

	INGUINALI	NON INGUINALI	X ²	P
numero casi	24	7	4,495008	0,05
ANESTRO SI	11 (61%)	7 (39%)		
ANESTRO NO	13 (100%)	0 (0%)		

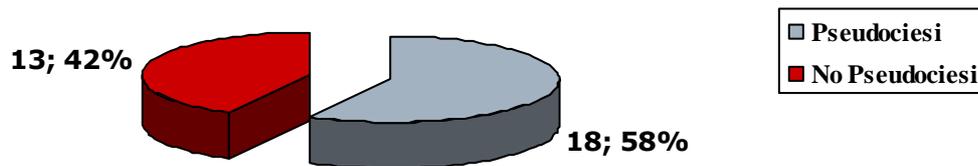
LOCALIZZAZIONE DEI NODULI IN BASE AL CICLO



Nella nostra popolazione la totalità delle neoplasie mammarie sviluppatesi durante il ciclo si trovava a livello inguinale evidenziando una correlazione statisticamente significativa tra il ciclo (inteso come la somma delle fasi di proestro, estro e diestro) e localizzazione inguinale con $P < 0,05$

In merito alla falsa gravidanza come fattore di rischio è stata raccolta l'anamnesi relativa ad episodi di pseudociesti assumendola come affermativa quando vi fosse stato almeno un episodio di ipertrofia mammaria con evidenza di secrezione latte. Il 58% dei soggetti aveva all'anamnesi episodi di pseudociesti.

ANAMNESIDI PSEUDOCIESI



Si è poi proceduto alla correlazione tra l'anamnesi di episodi di pseudociesti con la localizzazione delle neoplasie, singolarità o molteplicità delle stesse ed istotipo. Non è emersa alcuna correlazione statistica tra anamnesi di falsa gravidanza e percentuale di malignità, molteplicità o localizzazione.

Nell'ambito della valutazione dei fattori prognostici ci siamo proposti di valutare l'influenza dell'ovariectomia eseguita in concomitanza alla mastectomia in soggetti affetti da carcinoma mammario in termini di incidenza di recidiva, nuova neoplasia, metastasi e morte.

Con questo obiettivo abbiamo preso in considerazione i casi di 48 cagne adulte intere di varie razze ed età compresa tra 5 e 14 anni (media 9,5) affette da carcinoma.

In nessun caso, durante la stadiazione si rilevava la presenza di metastasi a distanza.

Dodici soggetti (25%) presentavano noduli singoli e 36 (75%) multipli.

In 26 soggetti (54%) le lesioni interessavano una stessa fila mammaria mentre in 22 casi (46%) le lesioni erano a carico di entrambe le file.

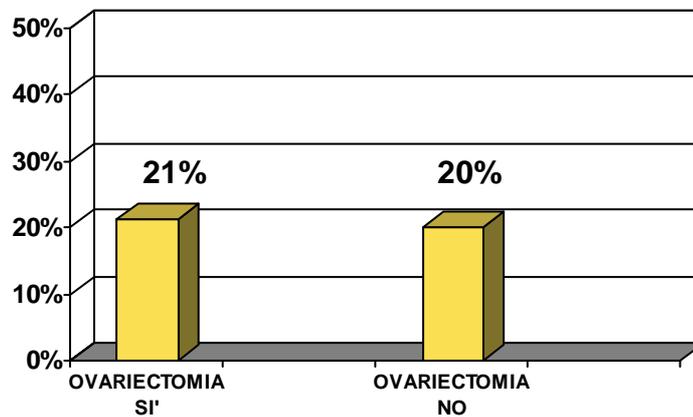
I criteri di escissione chirurgica del tessuto mammario sono stati i medesimi per tutti i soggetti: mastectomia regionale craniale per neoplasie interessanti solo le mammelle toraciche, mastectomia regionale caudale con asportazione del linfonodo inguinale per le neoplasie interessanti solo la mammella inguinale e/o la mammella addominale caudale e mastectomia dell'intera fila mammaria con il linfonodo inguinale per neoplasie presenti a livello della mammella addominale craniale. Il linfonodo ascellare è stato asportato solo quando aumentato di volume. Si è optato per le opportune combinazioni di tali tecniche in base alla distribuzione di noduli multipli.

In 28 soggetti (58% dei casi) si è proceduto ad eseguire concomitante ovariectomia mentre i rimanenti 20 soggetti (42%) hanno subito solo mastectomia.

La distribuzione dei soggetti nelle due popolazioni è avvenuta in maniera casuale in base alle richieste del proprietario. Nessun soggetto è stato sottoposto a protocolli chemioterapici pre o post-chirurgici né a trattamenti radianti. Tutti sono stati sottoposti ogni sei mesi a visita clinica e ristadiatione (RX torace in tre proiezioni ed eco

addominale e TC nei casi dubbi) per un follow up totale di due anni (730 giorni). Si sono considerati gli eventi: recidiva (ricomparsa di tessuto neoplastico nel sito di asportazione chirurgica caratterizzato dallo stesso istotipo), nuova neoplasia, metastasi e morte.

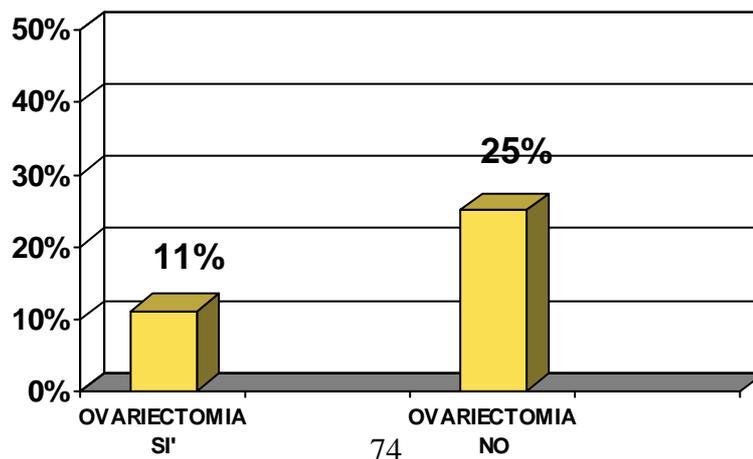
L'evento morte entro i due anni di follow up a causa della neoplasia mammaria si è verificato in 6 soggetti ovariectomizzati (21%) ed in 4 soggetti non ovariectomizzati (20%).



L'elaborazione statistica di tali dati ha evidenziato come l'ovariectomia non abbia avuto, nella nostra popolazione, nessuna influenza sul tempo di sopravvivenza post chirurgico considerato a 6, 12 e 24 mesi.

	OVARIECTOMIA	NO OVARIECTOMIA	χ^2	P
	n casi 28	n casi 20		
VIVI A 6 MESI	n: 25 (89%)	n: 19 (95%)	0,3117	NS
NON VIVI A 6 MESI	n: 3 (11%)	n: 1 (5%)		
VIVI A 1 ANNO	n: 23 (82%)	n: 17 (85%)	0,01714	NS
NON VIVI A 1 ANNO	n: 5 (18%)	n: 3 (15%)		
VIVI A 2 ANNI	n: 22 (79%)	n: 16 (80%)	0,05774	NS
NON VIVI A 2 ANNI	n: 6 (21%)	n: 4 (20%)		

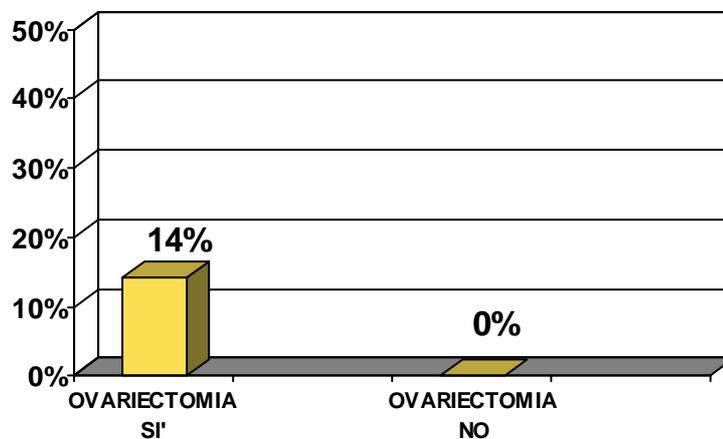
L'evento metastasi si è verificato in 3 soggetti ovariectomizzati (11%) ed in 5 soggetti non ovariectomizzati (25%).



L'elaborazione statistica di tali dati ha evidenziato come l'ovariectomia non abbia avuto, nella nostra popolazione, alcuna influenza sullo sviluppo di metastasi a distanza nel periodo post chirurgico.

	OVARIECTOMIA	NO OVARIECTOMIA	χ^2	P
	n casi 28	n casi 20		
METASTASI SI	n: 3 (11%)	n: 5 (25%)	0,84	NS
METASTASI NO	n: 25 (89%)	n: 15 (75%)		

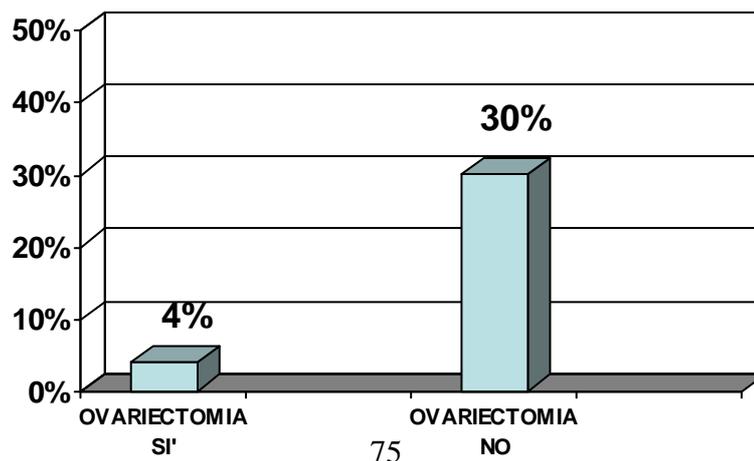
L'evento recidiva si è presentato in 4 soggetti ovariectomizzati (14%) ed in nessuno soggetto non ovariectomizzato (0%).



L'elaborazione statistica di tali dati ha evidenziato come l'ovariectomia non abbia avuto, nella nostra popolazione, alcuna influenza sullo sviluppo di recidiva nel periodo post chirurgico.

	OVARIECTOMIA	NO OVARIECTOMIA	χ^2	P
	n casi 28	n casi 20		
RECIDIVA SI	n: 4 (14%)	n: 0 (0%)	1,52727	NS
RECIDIVA NO	n: 24 (86%)	n: 20 (100%)		

L'evento nuova neoplasia si è verificato in 1 soggetto ovariectomizzato (4%) ed in 6 soggetti non ovariectomizzati (30%).



L'elaborazione statistica di tali dati ha evidenziato come l'ovariectomia abbia avuto, nella nostra popolazione, influenza statisticamente significativa sul rischio di sviluppo di nuova neoplasia nel periodo post chirurgico con una $P < 0,05$.

	OVARIECTOMIA	NO OVARIECTOMIA	χ^2	P
	n casi 28	n casi 20		
NUOVA NEOPLASIA SI	n: 1 (4%)	n: 6 (30%)	4,59214	<0,05
NUOVA NEOPLASIA NO	n: 27 (96%)	n: 14 (70%)		

L'importanza prognostica dell'esame istopatologico è ampiamente documentata in letteratura. In questa sede abbiamo voluto metterla in relazione con il valore predittivo della stadiazione clinica TNM.

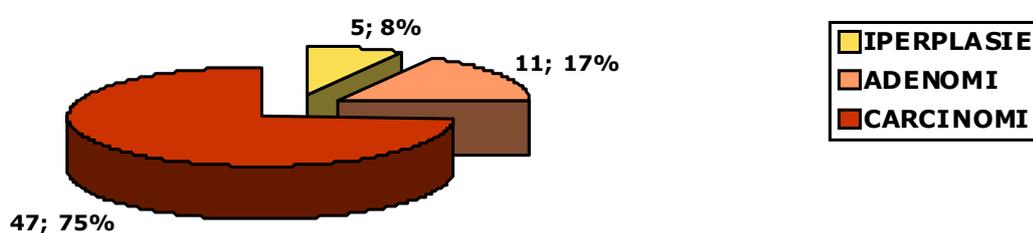
A tale scopo sono state selezionate 63 cagne affette da neoformazione mammaria accomunate dallo stesso stadio clinico TNM.

Alla visita clinica tutte le cagne presentavano noduli singoli (quindi 63 lesioni totali) di dimensioni inferiori ai 40 mm di diametro. Ciascun soggetto è stato sottoposto a RX torace in tre proiezioni ed eco addominale. In nessun caso si rilevava la presenza di metastasi a distanza.

Tutte le neoformazioni sono state asportate mediante mastectomia presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università degli Studi di Pisa. In tutti i soggetti è stato asportato in corso di chirurgia il linfonodo regionale nessuno dei quali è risultato essere positivo per metastasi. Tutti i casi rientravano quindi nei primi due stadi della classificazione clinica TNM. Ogni pezzo anatomico, insieme al linfonodo regionale, è stato inviato intero in formalina al 10% al Dipartimento di Patologia Animale dell'Università degli Studi di Pisa per la diagnosi istopatologica. Le lesioni sono state quindi suddivise tra benigne e maligne. I carcinomi mammari sono stati classificati secondo la classificazione del WHO in semplici e complessi e in sottotipi tubulare, solido e anaplastico. Ogni carcinoma è stato quindi classificato in base al grado (Gilbertson et al. 1983). Inoltre abbiamo valutato l'indice mitotico ed il grado di Elston Ellis. Per ogni soggetto è stato quindi attuato un follow up di 2 anni rilevando gli eventi: nuova neoplasia, recidiva, metastasi e morte. Gli eventi sopra riportati sono stati quindi correlati con i risultati istopatologici e con una maggiore o minore sopravvivenza mediante elaborazione statistica con test del χ^2 al fine di evidenziare eventuali correlazioni statisticamente significative.

Delle 63 neoformazioni esaminate il 25%(16) erano lesioni benigne (11 adenomi e 5 lesioni iperplastiche) ed il 75%(47) erano carcinomi.

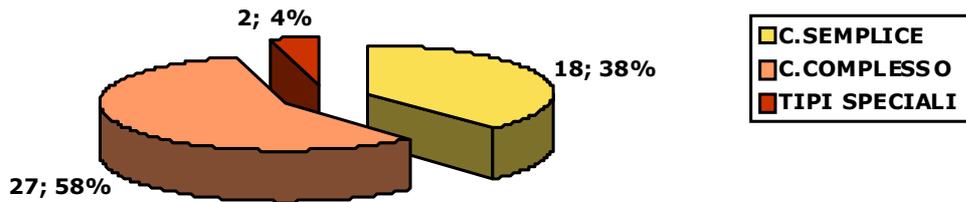
ISTOTIPO



I cacinomi sono stati così classificati:

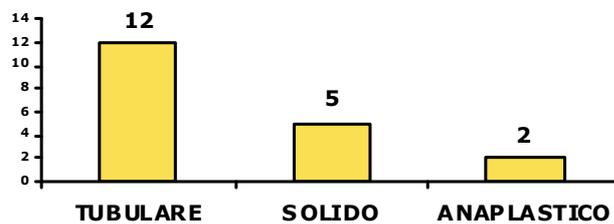
ISTOTIPO	C.SEMPLICE	C.COMPLESSO	TIPI SPECIALI
N. CASI (47)	38%(18)	58%(27)	4%(2)

ISTOTIPO



Dei 18 semplici 12 erano tubulari, 5 solidi e 2 anaplastici.

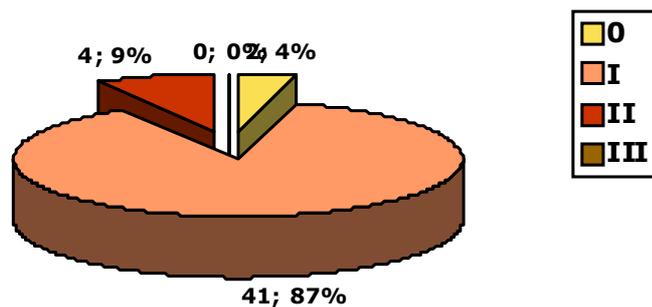
CLASSIFICAZIONE CARCINOMI SEMPLICI



Per quanto concerne invece il grado istologico i risultati sono stati i seguenti:

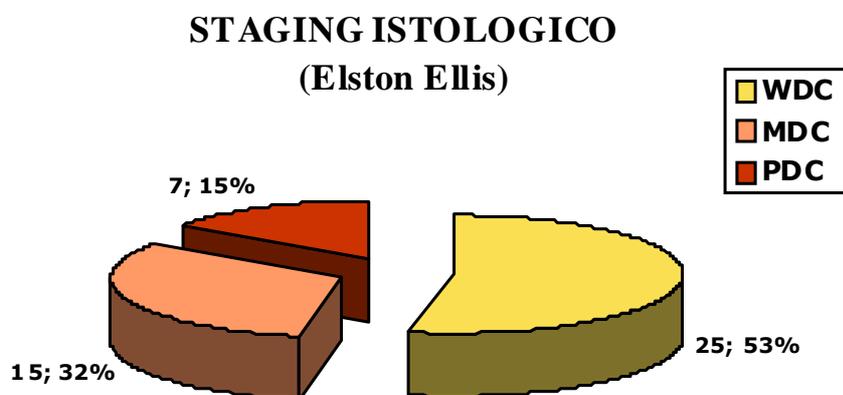
GRADE ISTOLOGICO	0	1	2	3
N. CASI (47)	4%(2)	87%(41)	9%(4)	0%(0)

GRADO ISTOLOGICO (Gilbertson et al.)



Abbiamo quindi proceduto alla classificazione delle neoplasie secondo il grading istologico di Elston Ellis con i seguenti risultati:

ELSTON ELLIS	WDC	MDC	PDC
N. CASI (47)	53%(25)	32%(15)	15%(7)



Per l'esecuzione di questa classificazione è stato inoltre valutato il numero di figure mitotiche in 10 campi microscopici a forte ingrandimento (400x).

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a follow-up di due anni con i seguenti risultati: 11 soggetti sono morti nel corso del follow-up per cause non ascrivibili alla neoplasia mammaria e sono quindi stati esclusi dall'elaborazione statistica dei risultati. Durante il follow up delle 36 cagne rimanenti abbiamo rilevato gli eventi: nuova neoplasia, recidiva, metastasi e morte con i seguenti risultati.

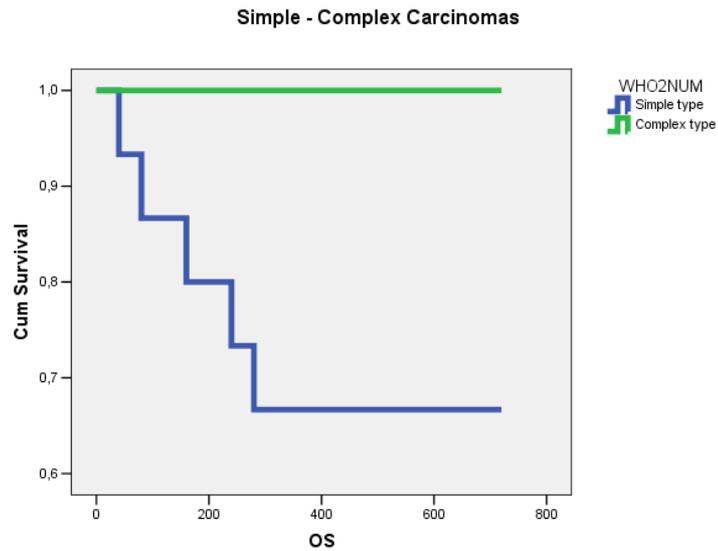
TIPO EVENTO	<i>NUOVA NEOPLASIA</i>	<i>RECIDIVA</i>	<i>METASTASI A DISTANZA</i>	<i>MORTE</i>	<i>SOPRAVVISSUTI</i>
N. CASI (36)	8	4	8	9	27

Si è proceduto quindi ad elaborazione statistica con test χ^2 :

ISTOTIPO	<i>NUOVA NEOPLASIA</i>	<i>RECIDIVA</i>	<i>METASTASI</i>	<i>MORTE</i>
CARCINOMA SEMPLICE/COMPLESSO	0,718	0,234	0,450	<u>0,002</u>

Esiste quindi una correlazione statisticamente significativa tra istotipo e morte del soggetto ($P < 0,05$)

CURVA DI SOPRAVVIVENZA KAPLAN-MEIER PER ISTOTIPO

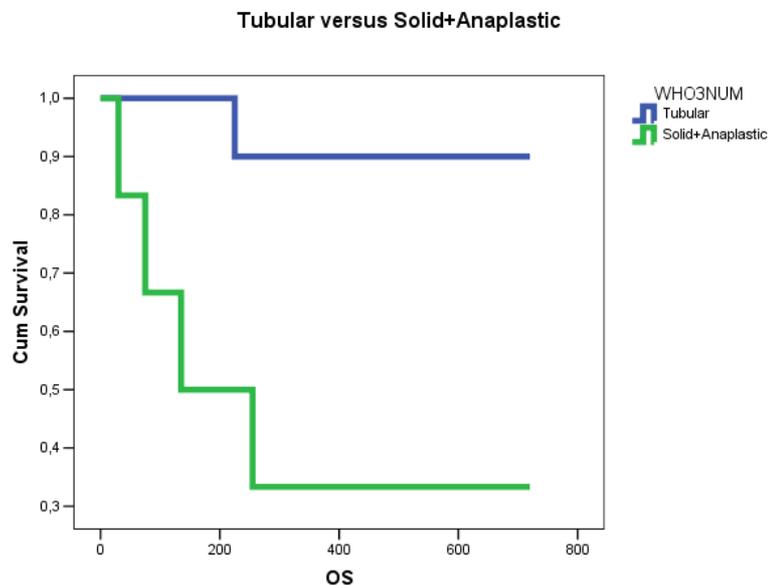


Con l'ulteriore classificazione dei semplici otteniamo:

ISTOTIPO	<i>NUOVA NEOPLASIA</i>	<i>RECIDIVA</i>	<i>METASTASI</i>	<i>MORTE</i>
TUBULARE vs SOLIDO- ANAPLASTICO	0,180	<u>0,007</u>	<u>0,001</u>	<u>0,018</u>

Esiste quindi una correlazione statisticamente significativa tra i diversi tipi di carcinoma semplice e l'insorgenza di recidiva e/o metastasi oltre che con la morte del soggetto ($P < 0,05$)

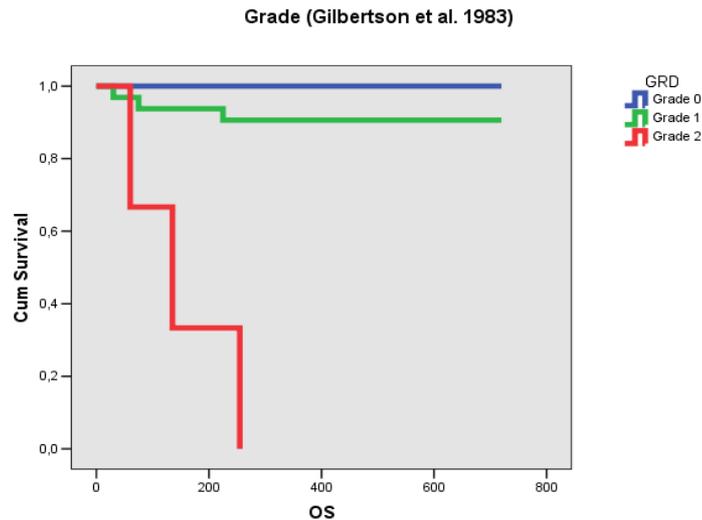
CURVA DI SOPRAVVIVENZA KAPLAN-MEIER PER ISTOTIPO



GRADO ISTOLOGICO (Gilbertson et al.)	NUOVA NEOPLASIA	RECIDIVA	METASTASI	MORTE
0+1 vs 2	0,334	0,217	0,072	<u>0,000</u>

Esiste quindi una correlazione statisticamente significativa tra grado istologico e morte del soggetto con ($P < 0,05$)

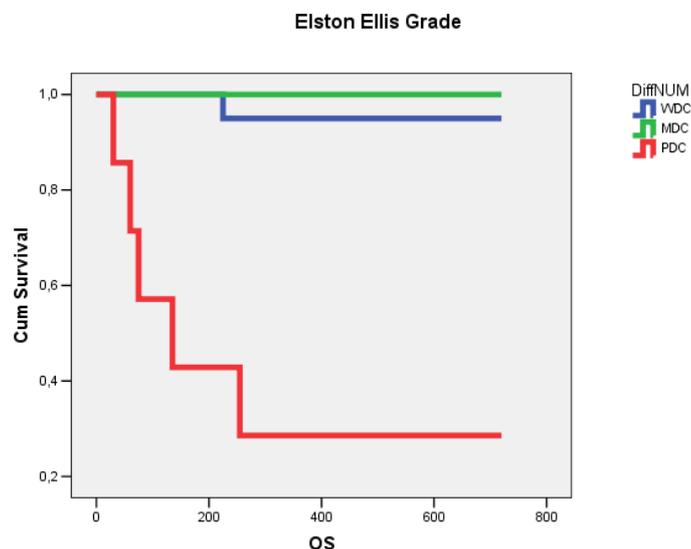
CURVA DI SOPRAVVIVENZA KAPLAN-MEIER PER IL GRADO ISTOLOGICO



GRADO DI ELSTON-ELLIS	NUOVA NEOPLASIA	RECIDIVA	METASTASI	MORTE
WDC – MDC vs PDC	0,194	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>

Esiste quindi una correlazione statisticamente significativa tra il grado di Elston-Ellis e l'insorgenza di recidiva e/o metastasi oltre che con la morte del soggetto ($P < 0,05$)

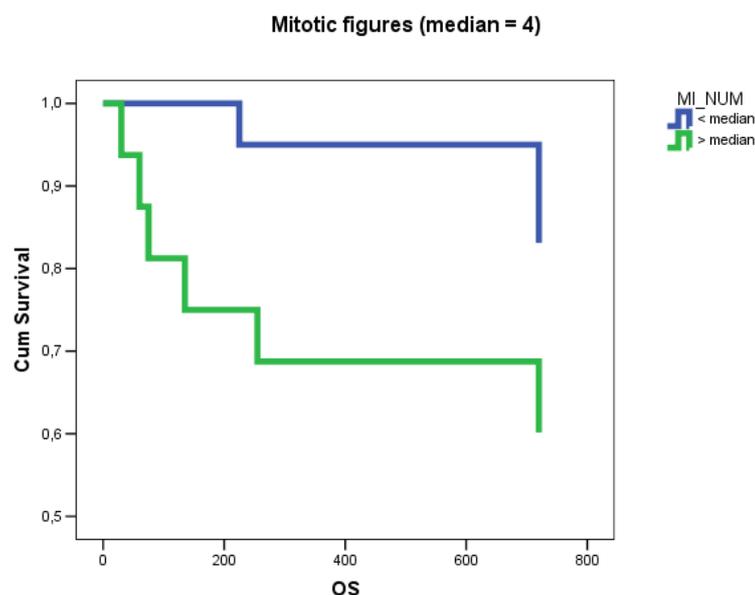
CURVA DI SOPRAVVIVENZA KAPLAN-MEIER PER IL GRADO DI ELSTON ELLIS



INDICE MITOTICO	NUOVA NEOPLASIA	RECIDIVA	METASTASI	MORTE
SOPRA/SOTTO LA MEDIANA	0,640	<u>0,015</u>	<u>0,048</u>	<u>0,036</u>

Esiste quindi una correlazione statisticamente significativa tra l'indice mitotico e l'insorgenza di recidiva e/o metastasi oltre che con la morte del soggetto ($P < 0,05$)

CURVA DI SOPRAVVIVENZA KAPLAN-MEIER PER INDICE MITOTICO



3.3 DISCUSSIONE

Per quanto riguarda la valutazione dei fattori di rischio segnaletici l'età dei soggetti della popolazione in studio si allinea perfettamente con la letteratura riportando una età media di insorgenza di 9,4 anni con il picco della casistica tra i 10 e gli 11 anni ed un range tra i 4 ed i 15 anni. Tali dati confermano come le neoplasie mammarie della cagna non possano essere considerate propriamente una patologia geriatrica ma piuttosto una patologia dell'animale adulto.

Per quanto riguarda l'incidenza di razza (dati normalizzati) non abbiamo rilevato un aumento del rischio nelle razze riportate in letteratura come setter, barbone, terrier in generale e pastore tedesco, pur presenti nella nostra popolazione, ad eccezione dello York Shire Terrier ($P < 0,05$). Si è invece evidenziato un aumento del rischio nella razza Dalmata ($P < 0,05$), dato assente in letteratura, ed una importante diminuzione del rischio nelle razze Labrador R. e Golden R. ($P < 0,01$). La vicinanza genetica tra Labrador e Golden fa ipotizzare la presenza di un comune fattore protettivo di origine genetica. Tali risultati non trovano conforto nella letteratura esistente e costituiscono quindi a nostro avviso un interessante spunto per indagini future su ampie popolazioni.

Perfettamente in linea con la letteratura i risultati riguardanti l'aumento del rischio nei cani in sovrappeso e nei soggetti alimentati con dieta non commerciale (in entrambi i casi $P < 0,01$). In letteratura è riportata l'ipotesi secondo la quale l'aumento del rischio di neoplasia mammaria nei cani alimentati con dieta non commerciale, sarebbe da imputare alla maggiore tendenza al sovrappeso di questi soggetti. Si suppone infatti che una dieta casalinga sia più ricca di grassi. Per verificare tale ipotesi abbiamo confrontato la percentuale dei cani sovrappeso nella popolazione alimentata con dieta commerciale con quella della popolazione alimentata con dieta non commerciale non trovando però correlazione tra tipo di dieta e stato di nutrizione. Tale risultato indicherebbe che regime alimentare casalingo e sovrappeso rappresenterebbero fattori di rischio per lo sviluppo di neoplasie mammarie indipendenti l'uno dall'altro. Tale osservazione pone le basi per studi futuri ed approfondimenti.

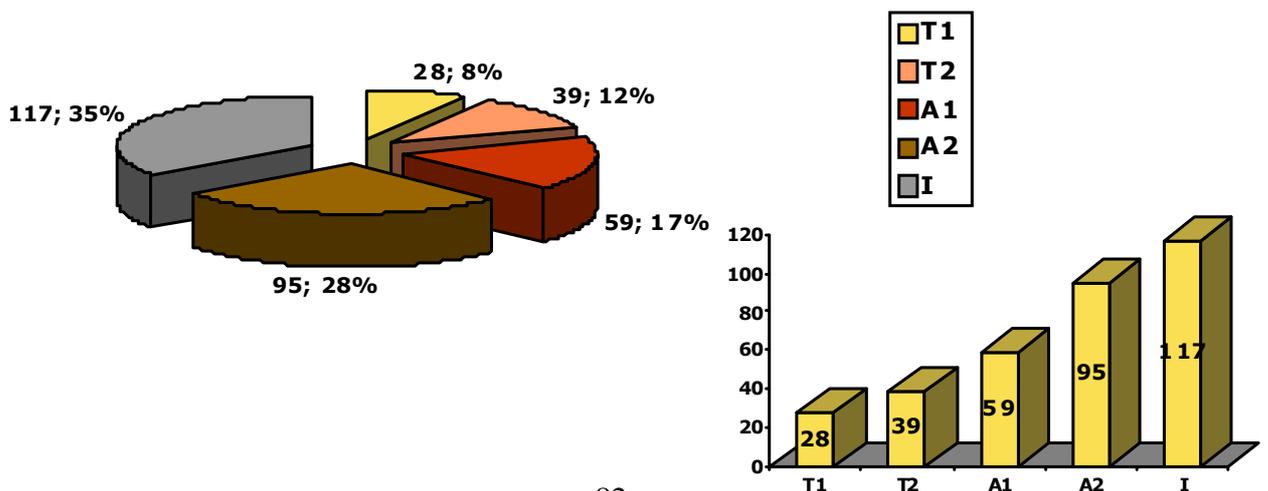
Per quanto concerne la taglia non abbiamo rilevato una distribuzione diversa tra i due gruppi distribuiti sopra e sotto la mediana di 24 Kg. In effetti anche in letteratura non è riportata una differente incidenza delle neoplasie mammarie in base alla taglia che invece sembra influire sulla percentuale di malignità. Diversi studi riportano infatti una maggiore incidenza di forme maligne nei soggetti di piccola taglia.

Confrontando l'incidenza delle neoplasie mammarie con l'ambiente abituale in cui vive il soggetto si è trovata correlazione statisticamente significativa ($P < 0,05\%$) tra il vivere in ambiente suburbano ed il rischio di sviluppo di neoplasia mammaria. Questo dato, assente in letteratura potrebbe essere ipoteticamente imputato alla maggiore concentrazione di industrie inquinanti in tali aree rispetto alla campagna ed al centro città. In realtà non è stata mai verificata una relazione tra agenti inquinanti e rischio di tumore mammario nel cane e neanche nella donna. Per poter confermare tale risultato andrebbe impostato uno studio su di una popolazione molto più ampia catalogata secondo criteri specifici ed univoci in relazione all'ambiente.

La distribuzione topografica delle neoformazioni sulle 5 coppie di mammelle è stata valutata indipendentemente su due sottopopolazioni con risultati sovrapponibili essendoci sempre un aumento dell'incidenza procedendo dalle mammelle toraciche verso le inguinali. Prendendo in considerazione l'insieme delle neoformazioni per un totale di 338 otteniamo la seguente distribuzione:

I TORACICA	II TORACICA	I ADDOMINALE	II ADDOMINALE	INGUINALE
n: 28 (8%)	n: 39 (12%)	n: 59 (17%)	N: 95 (28%)	n: 117 (35%)

DISTRIBUZIONE TOPOGRAFICA (n:338)



Con il 63% dei noduli presenti a livello delle ultime due mammelle caudali i nostri dati si allineano con la letteratura esistente che spiega tale evidenza con la tendenza all'aumento del tessuto mammario in senso cranio-caudale.

Non è risultato esserci un momento del ciclo della cagna nel quale si abbia un incremento dell'insorgenza di neoformazioni mammarie. Il rischio di insorgenza è lo stesso in tutte le fasi del ciclo compreso l'anestro.

Dal nostro studio è emersa invece una correlazione statisticamente significativa ($P < 0.05$) tra la localizzazione della neoformazione e la fase del ciclo nella quale si trova la cagna al momento dell'insorgenza. In particolare durante il ciclo (proestro+estro+diestro) vi sono maggiori probabilità che le neoformazioni che eventualmente insorgono interessino le mammelle inguinali. Abbiamo altresì rilevato che in nessun soggetto della nostra popolazione sono insorti noduli che non fossero inguinali durante il ciclo. Nella fase di anestro invece gli eventuali noduli insorti hanno interessato indifferentemente tutte le mammelle pur mantenendo una maggiore incidenza a livello delle caudali.

Il riscontro di una maggiore probabilità di insorgenza a livello inguinale è riportata in letteratura ed imputata alla maggiore quantità di tessuto mammario a questo livello. La correlazione di tale dato con la fase del ciclo suggerisce però anche un potenziale ruolo dell'assetto ormonale del soggetto. In effetti alcuni autori hanno rilevato la presenza, soprattutto nelle cagne adulte, di una concentrazione maggiore di recettori per gli estrogeni a livello del IV e V paio di mammelle caudali. In particolare tale incremento di concentrazione si evidenzia nella prima parte del diestro. Sempre secondo gli stessi autori i recettori per il progesterone non variano con età e localizzazione mammaria e risultano significativamente meno concentrati nella prima parte del diestro (Donnay I et al. *Changes in oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor concentrations and affinities during the oestrous cycle in the normal mammary gland and uterus of dogs.* *Vet Res Commun.* 19(2):101-13 (1995))

Alla luce di tali considerazioni si ipotizza che gli estrogeni possano giocare un ruolo di fondamentale importanza nella maggiore incidenza di neoplasie mammarie a livello inguinale durante il ciclo, in associazione alla maggiore quantità di tessuto mammario a questo livello. Tali osservazioni ci appaiono degne di ulteriori approfondimenti anche nella prospettiva di futuri protocolli terapeutici.

Sempre nel valutare il potenziale ruolo dell'assetto ormonale sullo sviluppo di neoplasie mammarie abbiamo analizzato il ruolo della pseudociesi. Nella popolazione in studio il 58% dei soggetti avevano all'anamnesi almeno un episodio di falsa gravidanza con secrezione latte mentre il 42% non ne aveva. Dall'elaborazione dei nostri dati non è però emersa alcuna correlazione statisticamente significativa tra anamnesi di falsa gravidanza e percentuale di malignità, né tra falsa gravidanza e molteplicità delle neoformazioni. Nessuna correlazione anche tra pseudociesi e localizzazione della neoformazione.

Tali risultati trovano pieno accordo con la gran parte della letteratura presente sull'argomento e sono a nostro avviso giustificati dal fatto che allo stato pratico non vi sono grosse differenze nell'assetto ormonale di una cagna che va incontro a pseudociesi rispetto ad una che non presenta tale fenomeno se non un calo tasso plasmatico del progesterone alla fine del diestro più o meno brusco.

Per quanto concerne invece l'influenza sulla prognosi dell'ovariectomia concomitante a mastectomia non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa per gli eventi recidiva, metastasi ed aspettativa di vita tra la popolazione che ha subito ovariectomia insieme a mastectomia (58%) e quella che ha subito invece la sola mastectomia (42%)..

La nostra popolazione si compone di soggetti adulti interi affetti da neoplasia mammaria epiteliale maligna in assenza di metastasi a distanza diagnosticabili.

Tale risultato trova ampio riscontro nella letteratura per quanto riguarda tutti e tre gli eventi sopracitati. Nella donna è invece riconosciuto all'ovariectomia (o comunque alla soppressione estrogenica) un ruolo molto importante nella prevenzione o nel ritardare l'insorgenza di metastasi a distanza in particolare per le neoplasie esprimenti i recettori per estrogeni.

Per quanto concerne invece l'evento nuova neoplasia questo si è verificato nel 30% dei soggetti sottoposti a sola mastectomia e solo nel 4% dei soggetti che avevano invece subito concomitante ovariectomia. Dall'elaborazione statistica di tali dati con metodo χ^2 tale differenza è risultata essere significativa con $P < 0,05$. Questo riscontro contrasta con la ricchissima bibliografia esistente sull'efficacia dell'ovariectomia nella prevenzione delle neoplasie mammarie solo se eseguita entro il secondo ciclo estrale o comunque entro i primi 2,5 anni di vita. Alcuni autori però concordano con i nostri risultati riportando comunque un effetto benefico dell'ovariectomia nell'out come del trattamento delle neoplasie mammarie del cane a prescindere dall'età del soggetto e dal numero di cicli estrali avuti senza però supportare tali affermazioni con studi statistici su ampia popolazione. Altri autori riportano sempre un effetto benefico dell'ovariectomia nell'out come del trattamento delle neoplasie mammarie del cane ma riferendosi esclusivamente all'evento nuova neoplasia benigna.

E' nostra intenzione approfondire tale argomento ampliando la popolazione in studio ed approfondendo le valutazioni inerenti l'espressione recettoriale delle neoplasie asportate in relazione all'assetto ormonale del soggetto affetto da neoplasia mammaria.

Per quanto riguarda gli istotipi della nostra popolazione abbiamo rilevato il 45% di neoplasie benigne vs il 55% di neoplasie maligne. In letteratura esistono percentuali diverse in diversi studi. Tendenzialmente riscontriamo come studi più recenti riportino percentuali di benignità maggiori rispetto a studi più datati. Tale aspetto è spiegabile con il fatto che la percentuale di malignità aumenta all'aumentare del tempo di insorgenza e delle dimensioni. Ciò rende evidente il fatto che tanto più la diagnosi è precoce tanto maggiori sono le probabilità di avere un istotipo benigno. La maggiore sensibilità che i proprietari hanno nei confronti del benessere dei loro animali ed i progressi della medicina veterinaria ha fatto negli ultimi dieci anni portare a diagnosticare e quindi a rimuovere più precocemente le neoplasie mammarie aumentando progressivamente la percentuale di benignità.

A tal proposito consideriamo la stadiazione clinica TNM che è quella che viene comunemente usata dal clinico per emettere una valutazione prognostica. I primi tre stadi, quando cioè non sono ancora presenti metastasi linfonodali o a distanza, differiscono esclusivamente per le dimensioni della neoplasia. Il gap dimensionale tra i tre stadi (<3 cm - >3<5 cm - > 5cm) è molto ampio ed oggi, per le motivazioni spiegate in precedenza, la maggior parte delle neoformazioni che vediamo hanno dimensioni ben inferiori ai tre cm ed è raro vederne di dimensioni maggiori ai 5 cm.

Proprio con l'intento di valutare il potere predittivo della stadiazione clinica TNM abbiamo selezionato una popolazione di soggetti affetti da carcinoma mammario in stadio I e II quindi con neoplasie di dimensioni inferiori a 5 cm e privi di metastasi al linfonodo regionale ed a distanza. In base alla sola stadiazione TNM tali soggetti verrebbero accumulati per un approccio terapeutico tendenzialmente privo di supporto chemioterapico ed una emissione prognostica simile.

Dai nostri dati emergono però differenze sostanziali nelle curve di sopravvivenza relative a diversi istotipi e gradi. Infatti il 100% dei cani con carcinoma complesso è vivo dopo due anni contro il 65% di quelli con carcinoma semplice. Di questi ultimi i tubulari hanno una prognosi decisamente migliore con il 90% dei soggetti vivi a due

anni contro il 35% di quelli con carcinoma semplice solido che è anche l'istotipo responsabile della totalità delle recidive e degli eventi metastatici. Solo il 30% dei cani con carcinomi scarsamente differenziati è vivo dopo 2 anni, con alta tendenza alla recidiva locale ed alle metastasi a distanza, mentre lo è la quasi totalità di quelli con carcinomi ben e moderatamente differenziati. Tutti cani con carcinomi di grado 2 sono morti entro un anno dalla chirurgia (pur avendo il linfonodo regionale indenne) mentre a due anni sono vivi il 90% di quelli con carcinoma di grado 1. Esiste inoltre una relazione inversamente proporzionale tra indice mitotico e sopravvivenza. Da questi dati emerge come la stadiazione TNM, fondamentale per gli stadi I - II, tralasciando la positività dei linfatici, non sia da sola sufficiente ad emettere una prognosi attendibile né a discriminare i soggetti per i quali sia indicata una chemioterapia adiuvante.

CONCLUSIONI

Le neoplasie mammarie rappresentano la forma neoplastica più frequente nella cagna. Nei paesi come l'Italia, nei quali non viene eseguita routinariamente l'ovariectomia precoce, tale patologia rappresenta il 25% di tutti tumori del cane ed il 50% dei tumori totali della cagna.

Circa il 50% delle neoplasie mammarie della cagna sono maligne.

Quest'alta incidenza è probabilmente all'origine del grande interesse che la comunità scientifica veterinaria ha dimostrato nei confronti di questo problema.

Esiste infatti una letteratura ricchissima su questo argomento con pubblicazioni sia inerenti ad argomenti prettamente clinici sia ad argomenti istopatologici.

La maggior parte degli studi clinici pubblicati è di tipo retrospettivo e porta spesso con sé dei limiti intrinseci per quanto riguarda la razionalizzazione del campionamento. Negli ultimi anni sono stati pubblicati studi prospettici molto interessanti e ben strutturati che però hanno spesso presentato il limite di avere popolazioni poco numerose.

Ad oggi è stato attribuito un peso ben preciso ad alcuni fattori di rischio e prognostici ma nonostante i molti studi esistono ancora diversi aspetti controversi di questa patologia sui quali troviamo in letteratura opinioni divergenti.

Il rischio di sviluppo di neoplasie mammarie nella cagna aumenta certamente in soggetti obesi, in quelli sottoposti a trattamenti ormonali per la soppressione dei cicli estrali così come un aumento del rischio si ha anche in quei soggetti alimentati con dieta casalinga.

Esistono razze, quali ad esempio terriers e spaniels, che sicuramente presentano una maggiore probabilità di sviluppare neoplasie mammarie rispetto ad altre.

Sappiamo per certo che abbiamo una riduzione del rischio nelle cagne ovariectomizzate precocemente, in quelle molto giovani ed in quelle molto anziane.

Anche sui fattori prognostici si sono acquisite ormai diverse certezze. Ad esempio il Pastore Tedesco ha generalmente una prognosi peggiore ed in generale i soggetti di grande taglia tendono mediamente a sviluppare neoplasie mammarie maligne in percentuale maggiore rispetto ai soggetti appartenenti a razze di piccola mole. Grandi dimensioni della massa, un lungo tempo di insorgenza, una rapida crescita, l'adesione ai piani sottostanti ed alterazioni infiammatorie, ulcerative o necrotiche sono aspetti sicuramente associati ad una prognosi peggiore così come lo è la diffusione metastatica. Sappiamo altresì che localizzazione topografica della neoplasia e numero di noduli non influenzano la prognosi.

Anche a diversi aspetti istopatologici è stato attribuito dalla letteratura un ruolo ed un peso certi. Sappiamo che i carcinomi semplici hanno prognosi peggiore dei complessi ed ancor di più se sono di tipo solido. La prognosi peggiora inoltre all'aumentare del grado istologico, del grado di indifferenziazione e dell'indice mitotico. Inoltre la possibilità di eseguire indagini immunoistochimiche ha permesso di confermare il ruolo prognostico negativo della perdita dei recettori per estrogeni e progesterone e dell'acquisizione di quelli per COX2.

Nonostante le molte certezze acquisite persistono però ancora molti aspetti controversi ai quali non è stato ad oggi attribuito un peso preciso.

Ad esempio è ancora controverso il ruolo della falsa gravidanza come fattore di rischio così come quello dell'ovariectomia praticata in concomitanza alla mastectomia come fattore prognostico. Non esistono studi in merito alla familiarità della patologia neoplastica mammaria del cane ed anche su un aspetto ampiamente studiato come i criteri di scelta dell'approccio chirurgico più opportuno vi è ancora aperto dibattito.

Il nostro studio va ad inserirsi in questo panorama con l'obiettivo di poter apportare un modesto contributo sulle conoscenze attuali dei fattori di rischio e prognostici clinici delle neoplasie mammarie della cagna.

Gli aspetti che abbiamo considerato sono molteplici, dalla predisposizione di razza al ruolo dello stato di nutrizione e del regime dietetico, dalla taglia fino all'ambiente in cui vive il soggetto. Abbiamo valutato il ruolo dell'influenza ormonale relativamente alla localizzazione delle neoplasie, alla anamnesi di falsa gravidanza ed alla fase del ciclo al momento dell'insorgenza come fattori di rischio. Ma anche come fattore prognostico rispetto alla ovariectomia nella cagna adulta rilevando nei due anni successivi gli eventi metastasi a distanza, recidiva, nuova neoplasia e morte.

Abbiamo anche discusso l'effettivo potere predittivo della stadiazione clinica TNM mettendola in correlazione con diverse classificazioni istopatologiche quali il tipo istologico, il grado secondo Gilbertson et al. e la differenziazione secondo Elson Ellis.

Il nostro studio conferma l'importanza di alcuni fattori segnaletici di rischio quali l'età adulta, l'obesità ed il regime alimentare nonché l'appartenenza o meno a determinate razze. Conferma altresì il ruolo di numerosi fattori prognostici quali il tipo istologico, il grado istologico secondo Gilbertson et al. e la differenziazione secondo Elston Ellis oltre all'indice mitotico. I nostri risultati collimano con la letteratura anche per quanto concerne l'ininfluenza di altri fattori quali la localizzazione topografica della neoplasia sulle mammelle e l'ovariectomia in concomitanza alla mastectomia in relazione al rischio di metastasi, recidiva e morte. Ininfluente anche l'anamnesi di falsa gravidanza in relazione a localizzazione delle neoformazioni, singolarità o molteplicità delle stesse ed istotipo.

Il nostro studio pone però anche alcuni nuovi spunti.

In relazione ai fattori di rischio è emersa una interessante riduzione del rischio di sviluppare neoplasia mammaria in cani di razza Golden Retriever e Labrador Retriever. Abbiamo riscontrato poi un aumento del rischio in relazione all'ambiente suburbano.

Si è invece rivelata influente la fase del ciclo rispetto alla probabilità di sviluppo della neoplasia mentre è risultata essere correlata con la localizzazione topografica sulle mammelle..

Per quanto concerne invece i fattori prognostici il nostro studio ha evidenziato una significativa riduzione del rischio di nuova neoplasia mammaria anche nei soggetti ovariectomizzati in età adulta, risultato questo in contrasto con la letteratura esistente.

Un altro aspetto emerso che a nostro avviso può rappresentare il punto di partenza per approfondimenti futuri è l'apparente inadeguatezza predittiva della stadiazione c-TNM per lo meno per quanto riguarda i primi due stadi.

Queste riflessioni rendono evidente come, nonostante le neoplasie mammarie della cagna siano probabilmente ad oggi la patologia neoplastica più studiata e sulla quale si hanno le conoscenze più approfondite, esistono ancora moltissimi interrogativi importanti che attendono risposta.

BIBLIOGRAFIA

- ❖ Aguggini G, Beghelli V, Giulio L. Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. UTET 2a edizione, 2006
- ❖ Ahern TE, Bird RC, Bird AAE, Wolfe LG. Expression of the oncogene *cerbB 2* in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Am J Vet Res* 57:693-696, 1996
- ❖ Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, Yeatman T, Balducci L, Ku N, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA* 11;276(22):1818-1822, 1996
- ❖ Badowska-Kozakiewicz AM, Malicka E. Expression of cyclooxygenase-2 in neoplasms of the mammary gland in bitches. *Pol J Vet Sci* 13(2):337-42, 2010
- ❖ Barone R. Anatomia comparata dei mammiferi domestici; Vol. 4° Splanchnologia. Edagricole
- ❖ Bjørnbæk C, Elmquist JK, Frantz JD, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*, Vol. 1, pp. 619-625, 1998
- ❖ Bojrab MJ, Ellison GW, Slocum B. *Tecnica chirurgica*; Vol. 1 Generalità, chirurgia generale, chirurgia specialistiche. UTET, 2001
- ❖ Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Monari I, Benazzi C. E-Cadherin and β -catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. *Vet Pathol* 42:781-787, 2005
- ❖ Bundgaard-Andersen K, Flagstad A, Jensen AL, Hellmén E, Trerè D. Correlation between the histopathological diagnosis by AgNOR count and AgNOR area in canine mammary tumors. *J Vet Intern Med* 22(5):1174-80, 2008
- ❖ Catalano S, Marsico S, Giordano C, Mauro L, Rizza P, Panno ML, Andò S. Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in MCF-7 cell line. *J. Biol. Chem.* vol. 278(31):28668-28676, 2003
- ❖ Catalano S, Mauro L, Marsico S, Giordano C, Rizza P, Rago V, Montanaro D, Maggiolini M, Panno ML, Andò S. Leptin Induces, via ERK1/ERK2 Signal, Functional Activation of Estrogen Receptor α in MCF-7 Cells. *J. Biol. Chem.* Vol. 279(19):19908-19915, 2004
- ❖ Chang SC et al. Prognostic factor associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *JAVMA* vol 227 No 10 November 15 (2005)
- ❖ Cooley DM e Waters DJ. Skeletal metastasis as the initial clinical manifestation of metastatic carcinoma in 19 dogs. *J Vet Intern Med* 12(4):288-293, 1998
- ❖ De Freitas R. Jr, Costa M.V., Schneider S.V., et al. Accuracy of ultrasound and clinical examination in the diagnosis of axillary lymph node metastases in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 17:240-244, 1991
- ❖ Dieudonne M.N., Mchinal-Quelin F., Serazin-Leroy V., Leneveu M.C., Pecquery R. and Giudicelli Y. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293-622-628, 2002
- ❖ Dobson J et al. *BSAVA manual of canine and feline oncology*. 2nd edition BSAVA publications, 2003

- ❖ Donnay I, Wouters-Ballman P, Devleeschouwer N, Leclercq G, Verstegen J. Changes in oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor concentrations and affinities during the oestrous cycle in the normal mammary gland and uterus of dogs. *Vet Res Commun* 19(2):101-13, 1995
- ❖ Dore M, Lanthier I, Sirois J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 40:207-212, 2003
- ❖ Dutra AP, Granja NVM, Schmitt FC, Cassali GD. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res* 37:1673-1681, 2004
- ❖ Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P et al. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med.* 69: 109-127, 2005.
- ❖ Ettinger SJ, Feldman EC. *Clinica Medica Veterinaria. Malattie del cane e del gatto.* Ed Elsevier, 2007
- ❖ Fernando SS, Wu X, McKenzie P et al. Immunohistochemical detection of p53 protein expression in mammary carcinoma: a study of 80 cases. *Pathology* 27(4):365-369, 1995
- ❖ Feldman EC, Nelson RW, *Endocrinologia e riproduzione del cane e del gatto*, Ed UTET Torino (1998)
- ❖ Fidler IJ, Abt DA, Brody RS. The biological behavior of canine mammary neoplasms. *J Am Vet Med Assoc* 151(10):1311-1318, 1967
- ❖ Fossum TW. *Chirurgia dei piccoli animali*, Ed elsevier masson, 2007
- ❖ Gama A, Alves A, Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch* 453:123-132, 2008
- ❖ Graham JC, Myers RK. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *J Vet Intern Med* 14(3):248-249, 2000
- ❖ Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE et al. Canine mammary epithelial neoplasms: biological implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Pathol* 20:127-142, 1983
- ❖ Gilson SD. Clinical management of the regional lymph node. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 25:149-167, 1995
- ❖ Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 220(3):391- 401, 1994
- ❖ Gobello C, Corrada Y. Canine mammary tumors: an endocrine clinical approach. *Compendium* August 2001 vol.23 n.8 (2001).
- ❖ Goldschmidt MH, Shofer FS, Smelstoy JA. Neoplastic lesions of the mammary gland. Aglepristone Decreases Proliferation in Progesterone Receptor-Positive Canine Mammary Carcinomas. In: Mohr U, Pathobiology of the aging dogs, pp 168-178, 2001
- ❖ Guil-Luna S., Sa´nchez-Ce´spedes R., Milla´n Y., De Andre´s F.J. , Rollo´n E., Domingo V., F. Guscetti, and J. Marti´n de las Mulas; *J Vet Intern Med* 2011;]:1–6
- ❖ Hankinson SE, Willett WC, Manson JE et al. Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 90:1292-1299, 1998
- ❖ Helewa M, Levesque P, Provencher D, Lea RH, Rosolowich V, Shapiro HM. Breast cancer, pregnancy, and breastfeeding. *J Obstet Gynaecol Can*, 24:164-180, 2002

- ❖ Hellemen E, Bergstrom R, Holmberg L. prognostic factors in canine mammary gland tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol* 30:20-27, 1993
- ❖ Heller DA, Clifford CA, Goldschmidt MH et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Vet Pathol* 42:776-780, 2005
- ❖ Innocenti VM, Ressel L, Poli A, Micheletti A, Vannozi I. Istotipo come fattore prognostico nelle neoplasie mammarie della cagna. VII Congresso Nazionale SIRA, Messina, 2009
- ❖ Innocenti VM, Ressel L, Poli A, Aria G, Vannozi I. Incidenza delle neoplasie mammarie della cagna per razza, taglia, età, regime alimentare, stato di nutrizione, ambiente e localizzazione topografica. VII Congresso Nazionale SIRA, Messina, 2009
- ❖ Innocenti VM, Ressel L, Parlanti E, Poli A, Vannozi I. Valutazione della fase del ciclo della cagna e anamnesi di pseudociesti in relazione alla insorgenza delle neoplasie mammarie. VIII Congresso Nazionale SIRA, Ozzano dell'Emilia, 2010
- ❖ Itoh T, Uchida K, Ishikawa K et al. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci* 67:345-347, 2005
- ❖ Kaaks R. Plasma insulin, IGF-I and breast cancer. *Gynecol Obstet Fertil* 29(3):185-91, 2001
- ❖ Kanae Y, Endoh D, Yokota H, Taniyama H, Hayashi M. Expression of PTEN tumor suppressor gene in malignant mammary gland tumors of dogs. *AJVR*, Vol 67, No. 1, 2006
- ❖ Kang S, Watnick RS. Regulation of tumor dormancy as a function of tumor-mediated paracrine regulation of stromal Tsp-1 and VEGF expression. *APMIS* 116:638-647, 2008
- ❖ Karayannopoulo M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med Series A* 48(2):85-96, 2001
- ❖ Karayannopoulo M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC et al. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol* 133:1-7, 2005
- ❖ Kurzman ID, Gilbertson SR. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg* 1:25-32, 1986
- ❖ La Guardia M, Giammanco M. Breast cancer and obesity. *Panminerva Med* 43(2):123-133, 2001
- ❖ Langenbach A, McManus P, Hendrick M, et al. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional methods for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. *J Am Vet Med Assoc* 218(9):1424-1428, 2001
- ❖ Lavallo GE, Bertagnolli AC, Tavares LF, Cassali GD. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol* 46:1275-1280, 2009
- ❖ Marcato PS. Anatomia e istologia patologica generale veterinaria. Società editrice Esculapio, 3a edizione, 2000
- ❖ Marconato L, Del Piero F. Oncologia medica dei piccoli animali. Poletto editore, 2005.
- ❖ Marconato L, Lorenzo RM, Abramo F, Ratto A, Zini E. Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. *Vet Comp Oncol* 6(2):90-101, 2008

- ❖ Martin de las Mulas J, Ordas J, Millan Y, Fernandez-Soria V, Ramon y Cajal S. oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat* 80:363-367, 2003
- ❖ Mc Vean DV et al. Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Vet Pathol* 15 700-715 (1978)
- ❖ Midsorp W. Canine mammary tumors: protective effect of late ovariectomy and stimulating effects of progestins. *Vet Q* 10:26-33, 1988
- ❖ Midsorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. (World Health Organization International Classification of Tumors of Domestic Animals, second series, vol. 7, no.2.) Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1999
- ❖ Millanta F, Calandrella M, Bari G, et al. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic and neoplastic canine and feline mammary tissue. *Res Vet Sci.* 79:225-232, 2005
- ❖ Millanta F, Citi S, Della Santa D, Porciani M, Poli A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment.* 98:115-235, 2006
- ❖ Morris JS Dobson JM, Bostock DE, O'Farrell E. Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasm. *Vet Rec* 142:656-658, 1998
- ❖ Nelson RW, Couto CG. *Medicina interna del cane e del gatto.* Ed Elsevier, 3a edizione, 2006
- ❖ Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, Sanchez MA, Flores JM, Castano M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 37:239-247, 2000
- ❖ Ogilvie GK, Moore AS. Nutritional support. In *Managing the veterinary cancer patient: a practice manual.* Trenton VLS ed 124-127, 1995
- ❖ Ogilvie GK. Neoplasie. In *Le neoplasie del cane.* Hill's Pet Nutrition Inc. 70, 1999
- ❖ Owen LN, World Health Organization TNM Classification of Tumors in Domestic Animals, 1st ed., pp 457-461, Geneva (1980)
- ❖ Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidoy E, Papazoglou LG et al. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol* 35(4):228-234, 2006
- ❖ Peña LL, Nieto AI, Pérez-Alenza D, Cuesta P, Castaño M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 10(3):237-46, 1998
- ❖ Pérez-Alenza MD, Rutteman GR, Pena L, et al. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Intern. Med.* 12: 132-139, 1998
- ❖ Pérez-Alenza MD, Tabanera E., Pena L. Inflammatory carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Assoc* 219(8):1110-1114, 2001
- ❖ Perren A, Weng LP, Boag AH et al. immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* 155:1253-1260, 1999

- ❖ Philibert JC, Snyder PW, Glickman N et al. influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Intern Med* 17:102-106, 2003
- ❖ Prall OW, Rogan EM, Sutherland RL. Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65(1-6):169-74, 1998
- ❖ Priester WA, McKay FW. The occurrence of tumors in domestic animals. *NCI Monograph 54*, National Cancer Institute, Bethesda, MD (1980)
- ❖ Queiroga FL, Pires I, Lobo L, Lopes CS. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 88:441-445, 2010
- ❖ Ressel L, Millanta F, Caleri E, Innocenti VM, Poli A. Reduced PTEN protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumors. *Vet Pathol* 46(5):860-8, 2009
- ❖ Rhei E, Kang L, Bogomolny F et al. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Res* 57:3657-3659, 1997
- ❖ Rodo A, Malicka E. E-cadherin immunohistochemical expression in mammary gland neoplasms in bitches. *Pol J Vet Sci* 11(1):47-54, 2008
- ❖ Romanelli G. *Oncologia del cane e del gatto*, Ed elsevier masson, 2007
- ❖ Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 16:423-428, 1998
- ❖ Rutteman GR. Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In vivo* 4:33-40, 1990
- ❖ Rutteman GR. Contraceptive steroids and the mammary gland: is there a hazard? *Insight from animal studies. Breast Cancer Research and Treatment* 23, 29-41, 1992
- ❖ Rutteman GR and Misdorp W Hormonal background of canine and feline mammary tumors. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 47: 483-487, 1993
- ❖ Sahin AA. Biological and clinical significance of HER-2/neu (cerbB-2) in breast cancer. *Adv Anat Pathol* 7:158-166, 2000
- ❖ Santos M, Marcos R, Faustino AM. *Histological Study of Canine Mammary Gland During the Oestrous Cycle. Reprod Domest Anim*, 2009
- ❖ Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G, Marcato PS. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *J Vet Diagn Invest* 14(1):25-34, 2002
- ❖ Schneider R et al. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Nat Cancer Inst* 43:1249-1261, 1969
- ❖ Shofer FS, Sonnenschein EG, Goldschmidt MH, Laster LL, Glickman LT. Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 13(1):49-60, 1989
- ❖ Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J Vet Intern Med* 14:266-270 (2000).
- ❖ Sorenmo KU. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin Small Animal*, 33:573-596, 2003
- ❖ Stoll BA. Teenage obesity in relation to breast cancer risk. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22(11):1035-40, 1998
- ❖ Stoll BA. Adiposity as a risk determinant for postmenopausal breast cancer. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24(5):527-533, 2000

- ❖ Suter PF, Lord PF. Radiographic differentiation of disseminated pulmonary parenchymal diseases in dogs and cats. *Vet Clin Morth Am* 4(4):687-710, 1974
- ❖ Thrall DE. Radiographic diagnosis of metastatic pulmonary neoplasia. *Compend of Cont Educ* 1:131-139, 1979
- ❖ Veronesi MC, Battocchio M, Rizzi C, Sironi G. Relationship between dysplastic and neoplastic mammary lesions and pseudopregnancy in the bitch. *Veterinary Research Communications*, 27 Suppl. 1:245-247, 2003
- ❖ Wakui S, Muto T, Yokoo K. Prognostic status of p53 mutations in canine mammary carcinoma. *Anticancer Res* 21(1B):611-616, 2001
- ❖ Wehling M. Specific nongenomic actions of steroid hormones. *Ann Rev Physiol* 56:365-395, 1997
- ❖ Withrow JS, Vail D. *Small Animal Clinical Oncology*. Ed. Saunders 4th ed, 2007
- ❖ Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumors. *J Small Animal Pract* 37:462-464, 1996
- ❖ Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on the TNM and histologic classification. *J Vet Med Sci* 58(7):1079-1083, 1996
- ❖ Zuccari DA, Santana AE, Cury PM, Cordeiro JA. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet Clin Pathol* 33(1):23-8, 2004

Ringrazio il personale docente e non docente del Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università degli Studi di Pisa per il supporto e la fiducia accordatimi in questi anni.

Ringrazio il Prof. Alessandro Poli e la Prof.ssa Simonetta Citi per la preziosa collaborazione.

Un ringraziamento speciale va al dott. Riccardo Finotello ed al dott. Tommaso Mannucci per tutto quello che mi hanno insegnato e che mi insegneranno della nostra professione ma soprattutto perché sono diventati amici veri, di quelli che non se ne può più fare a meno. E ringrazio la dott.ssa Ilaria Lippi con la quale ho condiviso stanza e confidenze. Ringrazio la dott.ssa Angela Briganti perché anche se a volte non la sopporto, anche se a volte non mi sopporta, ci capiamo al volo e ci sosteniamo sempre.

Ringrazio il dott. Lorenzo Ressel per l'importante contributo scientifico dato a questo lavoro, per i preziosi consigli e le grasse risate.

Ringrazio mio figlio Edoardo Maria che è venuto al mondo durante la stesura di questa tesi: lo ringrazio per avermi fatto dormire di notte e lavorare di giorno ma soprattutto perché mi ha spiegato, con un solo sguardo, il senso della vita.

Infine ringrazio Iacopo per la competenza e la professionalità con le quali mi ha aiutato nello svolgimento di questo lavoro. E poi lo ringrazio per tutto il resto, per tutto quanto ed anche di più. Semplicemente perché è la mia vita.