



Università degli Studi di Padova

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA
Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria

DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA E IGIENE VETERINARIA

**Studio dell'espressione nel tumore mammario del cane del
recettore HER2/Neu e correlazioni prognostiche.**

Relatore:
Chiar.ma Prof. Valentina Zappulli

Controrelatore:
Chiar.mo Prof. Tomaso Patarnello

Candidato:
Matteo Casagrande
Matricola 459826/MV

Anno Accademico 2006–2007

Alla mia famiglia

Great spirits have always encountered opposition from mediocre minds. The mediocre mind is incapable of understanding the man who refuses to bow blindly to conventional prejudices and chooses instead to express his opinions courageously and honestly.

Albert Einstein,
physicist (1879 - 1955)

Indice

1	CONSIDERAZIONI GENERALI	1
1.1	Cenni di anatomia ed embriologia della ghiandola mammaria .	1
2	IL TUMORE MAMMARIO	7
2.1	Incidenza	7
2.2	Eziologia	8
2.2.1	Ormoni e fattori di crescita	8
2.2.2	Fattori ambientali	11
2.2.3	Fattori genetici	11
2.3	Patogenesi	12
2.4	Origine istologica	15
2.5	Classificazione istologica	17
2.6	Segni, sintomi clinici e diagnosi	25
2.7	Comportamento biologico e prognosi	29
2.8	Trattamento	33
3	OGGETTO DELLA VALUTAZIONE	37
3.1	Oncogene c-erbB-2	37
3.2	Proteina Ki-67	45
3.2.1	Il ciclo cellulare	45
3.2.2	La proteina	47
4	OBIETTIVI DELL'INDAGINE	53
5	MATERIALI E METODI	55
5.1	Campioni	55
5.1.1	Protocollo di preparazione dei vetrini adiuvati con silano	55
5.2	Procedura immunoistochimica	56
5.2.1	Procedura immunoistochimica manuale	56
5.2.2	Procedura immunoistochimica automatica	58
5.3	Valutazione della colorazione immunoistochimica	59
5.3.1	Procedura immunoistochimica manuale vs. automatica .	59
5.3.2	Recettore HER2	60
5.3.3	Marker di proliferazione Ki-67	60
5.4	Raccolta informazioni di follow-up	61
5.5	Analisi statistica	61

6	RISULTATI	63
6.1	Indagine immunohistochemicala	63
6.2	Valutazioni statistiche dei risultati	72
7	DISCUSSIONE	75
A	WHO Classificazione istologica dei tumori mammari del cane	79
B	Questionario utilizzato per la raccolta dei dati di follow-up	85
C	Tavole fotografiche	89
	Bibliografia	105
	Ringraziamenti	121

Elenco delle figure

1.1	Schema dello sviluppo della ghiandola mammaria. Da internet, SUNMED.ORG , http://www.sunmed.org/devbreast.html ; 05/01/07.	2
1.2	Microfotografia della struttura di un TEB. Da internet, Biology of the mammary gland , http://mammary.nih.gov/index.html ; 05/01/07.	3
1.3	Particolare di un TEB. Da internet, Biology of the mammary gland , http://mammary.nih.gov/index.html ; 05/01/07.	4
1.4	Microfotografia con microscopio elettronico a trasmissione dell'aspetto di un acino mammario. Da internet, University of Delaware Department of Biological Sciences , http://www.udel.edu/Biology/Wags/histopage/empage/efr/efr.htm ; 05/01/07.	5
1.5	Drenaggio linfonodale della ghiandola mammaria del cane. Da Marcato,[87] <i>modificata</i>	6
3.1	Schema ridotto delle vie metaboliche attivate da HER2. Da internet, Universitat Leipzig Department of Molecular and Forensic Toxicology , http://www.uni-leipzig.de/ag-hengstler/topic3.htm ; 05/01/07.	41
3.2	Schema ridotto dell'espressione delle cicline e delle CDK durante il ciclo cellulare. Da Obaya 2002[114], <i>modificata</i>	46
3.3	Schema ridotto delle vie metaboliche coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare. I geni evidenziati in rosso sono quelli di cui si conoscono alterazioni nelle neoplasie. Da Hanahan 2002[58], <i>modificata</i>	48
3.4	Dominio FHA di Ki-67. Da internet, Ohio State University Department of Chemistry , http://www.chemistry.ohio-state.edu/~tsai/fha_domain.htm ; 24/01/07.	50
C.1	Carcinoma tubulare complesso, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)	91
C.2	Carcinoma tubulare semplice, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)	91
C.3	Carcinoma solido complesso con mioepitelioma maligno, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)	93
C.4	Carcinoma solido semplice con invasione dei vasi linfatici, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)	93
C.5	Adenoma tubulare complesso, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)	95

C.6	Adenoma tubulare semplice, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)	95
C.7	Controllo positivo per HER2 neoplasia mammaria 3+, ghiandola mammaria (20X)	97
C.8	Controllo positivo per Ki-67 centro germinativo linfonodale, linfonodo cane (20X)	97
C.9	Adenoma tubulare complesso HER2 positivo 2+, caso 56, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)	99
C.10	Adenoma tubulare complesso HER2 positivo 2+, caso 56, ghiandola mammaria cane (20X)	99
C.11	Adenoma tubulare complesso HER2 positivo 2+ colorazione per Ki-67, caso 56, ghiandola mammaria cane (20X)	101
C.12	Carcinoma in tumore misto benigno HER2 positivo 2+, caso 54, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)	101
C.13	Carcinoma in tumore misto benigno HER2 positivo 2+, caso 54, ghiandola mammaria cane (20X)	103
C.14	Carcinoma in tumore misto benigno HER2 positivo 2+ colorazione per Ki-67, caso 54, ghiandola mammaria cane (20X)	103

Elenco delle tabelle

2.1	Reattività dei diversi componenti della ghiandola mammaria canina.[26, 53, 63, 171, 173] Da Meuten,[95] <i>modificata</i>	16
2.2	Tabella riassuntiva i principali tipi istologici di tumore mammario del cane in relazione ai tessuti coinvolti. Legenda: B: componente benigna; M: componente maligna; nc: non coinvolto; (...): componente che può anche mancare.	18
2.3	Stadiazione clinica dei tumori mammari del cane modificata[179] (con esclusione del carcinoma infiammatorio). Da Sorenmo,[153] <i>modificata</i>	29
2.4	Sistema di grading istologico per i carcinomi mammari del cane. Da Meuten,[95] <i>modificata</i>	31
2.5	Fattori prognostici nel cane e nella donna. Da Meuten,[95] <i>modificata</i>	32
2.6	Linee guida di trattamento proposte per il tumore maligno del cane basate sulle dimensioni tumorali, lo staging, il tipo istologico e la differenziazione. Da Sorenmo,[153] <i>modificata</i> . . .	34
3.1	Classificazione dei ligando della famiglia ErbB. Da Casalini,[16] <i>modificata</i>	40
5.1	Preparazione del tampone citrato 0,01 M a pH 6 per lo smascheramento termico.	57
5.2	Preparazione di PBS 0,2 M a pH 7 per i lavaggi. Legenda: WS: Work Solution; SS: Storage Solution	57
5.3	Riepilogo schematico dei protocolli seguiti per l'esecuzione dell'IHC manuale sulle tre proteine relative all'indagine. Legenda: * Nonostante l'anticorpo sia diluito in BSA al 2,5% in PBS si preferisce effettuare comunque un preventivo lavaggio in PBS dopo il blocking.	58
5.4	Riepilogo schematico dei protocolli seguiti dalla macchina per l'IHC.	59
5.5	Classificazione dell'espressione di HER2 determinata tramite IHC metodo Hercep Test (Dako)	60
6.1	Dati di segnalamento disponibili per i casi presi in considerazione durante la prova sperimentale.	64

6.1	Dati di segnalamento disponibili per i casi presi in considerazione durante la prova sperimentale.	65
6.1	Dati di segnalamento disponibili per i casi presi in considerazione durante la prova sperimentale.	66
6.2	Tabella riassuntiva delle lesioni neoplastiche riscontrate nei casi sottoposti a indagine IHC.	67
6.2	Lesioni neopastiche	68
6.3	Tabella riassuntiva delle lesioni neoplastiche riscontrate con diagnosi morfologica, positività a HER2 e Ki67. Legenda: † lesione border line.	68
6.3	Lesioni neopastiche	69
6.3	Lesioni neopastiche	70
6.3	Lesioni neopastiche	71
6.4	Tabella riassuntiva delle valutazioni statistiche tramite test di Wilcoxon.	73
6.5	Tabella riassuntiva delle valutazioni statistiche tramite test di correlazione di Spearman.	73

Capitolo 1

CONSIDERAZIONI GENERALI

1.1 Cenni di anatomia ed embriologia della ghiandola mammaria

La ghiandola mammaria è un organo di importanza tale da aver suggerito il nome per l'intera classe dei mammiferi. Dal punto di vista evolutivo viene considerata una specializzazione delle ghiandole sudoripare ed è deputata alla produzione del latte, l'alimento principe del neonato nel primo periodo della sua vita. Istologicamente è una ghiandola tubuloalveolare composta a secrezione apocrina per le componenti lipidiche (espulse assieme a piccole porzioni di citoplasma) e merocrina per quelle proteiche (espulse mediante esocitosi).

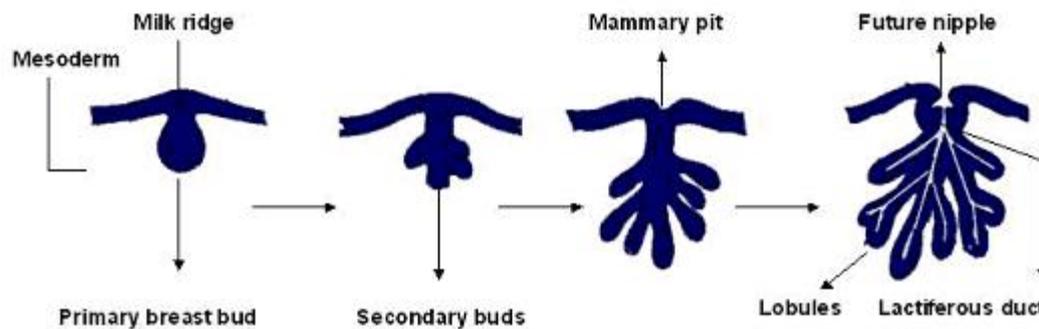
Le mammelle sono disposte lungo due linee paramediane, dette **linee** o **file mammarie**, che vanno dall'ascella all'inguine; sono 4-6 per lato e vengono distinte in base alla posizione in: toracica (**gh. toracica**), addominali (**gh. addominale craniale e caudale**) e inguinali (**gh. inguinale craniale e caudale**). La loro forma e volume cambiano in modo significativo in base allo stato funzionale rendendo più o meno evidenti il solco intermammario, che divide le due linee mammarie, e i solchi trasversali che distinguono le mammelle di una stessa fila.

Le mammelle sono presenti in entrambi i sessi, ma mentre nel maschio restano rudimentali, nella femmina si accrescono rapidamente a partire dall'inizio della pubertà e completano lo sviluppo durante la gravidanza, fino a divenire pienamente attive dopo il parto.

A livello embrionale, i primi segni di sviluppo dell'organo mammario sono le cosiddette **linee del latte**, due cordoni ectodermici che corrono lungo la superficie ventrale dell'embrione dagli abbozzi degli arti anteriori a quelli posteriori. Zone specifiche delle linee del latte, diverse per numero e posizione a seconda della specie, si ispessiscono e formano le **creste del latte**; queste, proliferando e invaginandosi nel mesenchima sottostante, formano i noduli mammari e quindi le **gemme mammarie**. Le gemme si allungano nel precursore del pannicolo adiposo mammario e iniziano a ramificarsi, dando origine alla nascita ad un rudimentale albero duttale. Contemporaneamente l'ectoderma epidermico sovrastante si solleva per formare il **capezzolo** (figura 1.1).[76]

Lo sviluppo primario del tessuto ghiandolare mammario è probabilmente

Figura 1.1: Schema dello sviluppo della ghiandola mammaria. Da internet, SUNMED.ORG, <http://www.sunmed.org/deobreast.html>; 05/01/07.

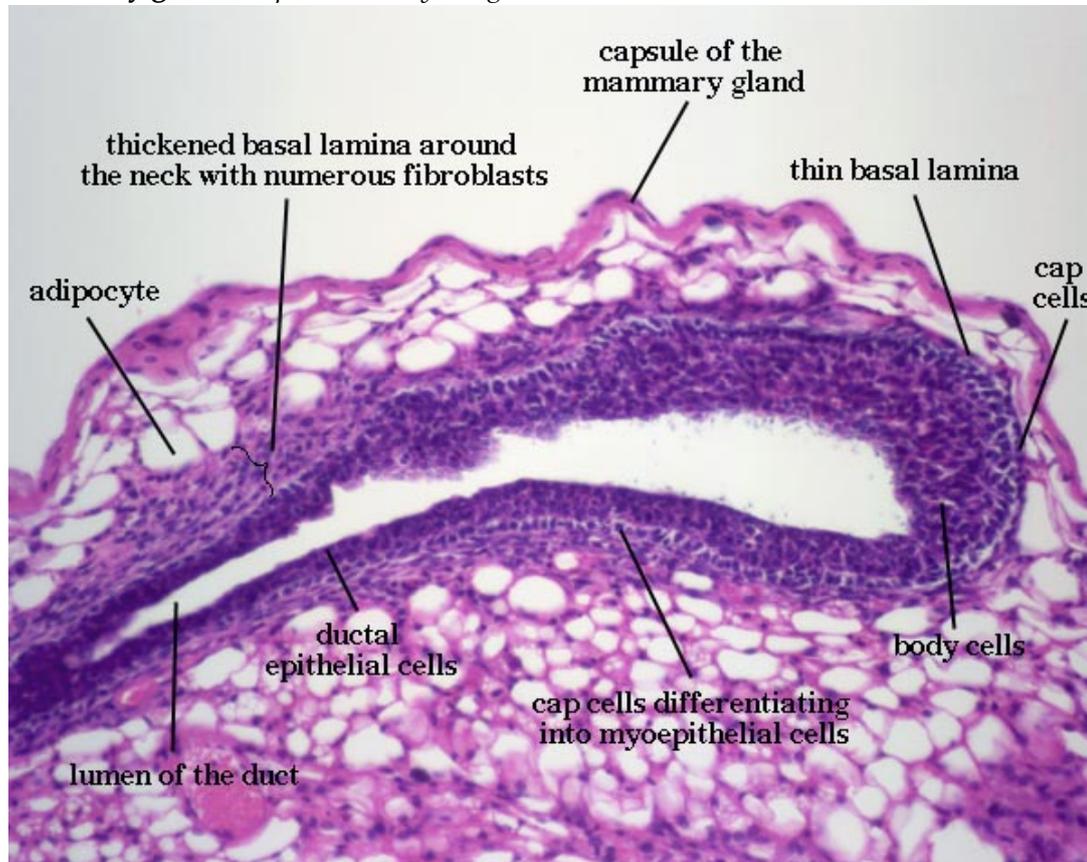


regolato da fattori di crescita locali e dai geni regolatori dello sviluppo (*developmental regulatory genes*) e sebbene questo sia considerato il periodo meno sensibile alla regolazione da parte degli ormoni, la struttura seppur primitiva, è capace di risposta. Viene inoltre suggerita l'idea che l'esposizione precoce allo stimolo ormonale possa influenzare il rischio di sviluppo tumorale; nel topo, infatti, l'esposizione fetale e neonatale al **dietilstilbestrolo** ha dimostrato di alterare la crescita mammaria e la sensibilità alla carcinogenesi nelle femmine adulte.[169]

Dalla nascita fino alla pubertà, non si hanno variazioni significative: i dotti rudimentali continuano ad allungarsi ma in proporzione alla crescita del resto del corpo (**crescita isometrica**). Non si conosce molto sulla regolazione in questa fase anche se sembra coinvolto lo "*Epidermal Growth Factor*" (**EGF**).[177]

Alla pubertà la ghiandola mammaria inizia a crescere rapidamente in modo tale da superare il rapporto con la superficie corporea (**crescita allometrica**). Strutture particolari, costituite da 4-6 strati di cellule epiteliali cubiche, formano il fondo cieco distale dei dotti rudimentali, i "*Terminal End Buds*" (**TEB**); sono punti di proliferazione, differenziazione e apoptosi cellulare.[23] Le cellule più periferiche o "*cap cell*" daranno origine allo strato di cellule mioepiteliali che inizierà a livello del "collo" dei TEBs, mentre altre (*body cells*) si differenziano nelle cellule epiteliali duttali e quelle più interne andranno incontro ad un processo apoptotico per dare origine al lume del dotto (vedi figure 1.2, 1.3). La ramificazione avviene con pattern dicotomo, cioè per biforcazione, e continua, contemporaneamente all'allungamento, dei dotti fino ad arrivare al limite del grasso mammario. A questo punto i TEBs regrediscono e la crescita si ferma. Il risultato finale è una rete di tubuli ramificati che riempiono il tessuto adiposo. Gli estrogeni (**E2**) sono necessari alla crescita della mammella durante la pubertà come dimostra la regressione dei TEBs dopo ovariectomia, ma non sono sufficienti.[22] Anche l'ormone della crescita (**GH**) e le somatomedine (**IGF-1**) sono importanti.[43] Dopo aver raggiunto i limiti del grasso mammario, i dotti vanno incontro a cicliche ramificazioni apparentemente regolate dai cicli estrali e in particolare dal progesterone (**P4**), segno che nonostante la regressione dei

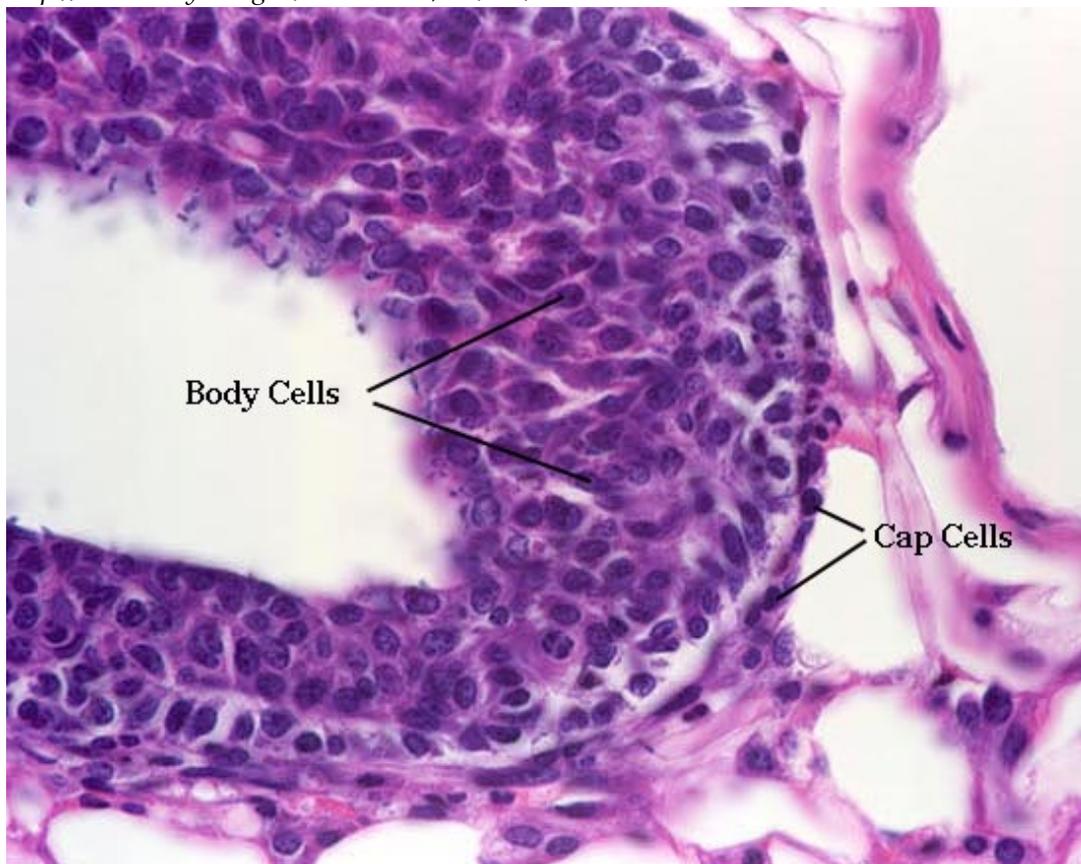
Figura 1.2: Microfotografia della struttura di un TEB. Da internet, **Biology of the mammary gland**, <http://mammary.nih.gov/index.html>; 05/01/07.



TEBs, rimangono strutture in grado di proliferare. Infatti nella zona di transizione tra l'epitelio dei dotti intralobari ed l'epitelio degli acini, si riconosce una popolazione cellulare di tipo epiteliale ma pluristratificato, cui è stato dato il nome di **zona TEBs-like**.

La cagna ha una mammella composta, cioè il corpo ghiandolare è formato da più unità mammarie indipendenti (*terminal ductal lobular unit* o **TDLU**), ognuna con la sua cisterna del latte e il rispettivo dotto papillare, di conseguenza il capezzolo è percorso da tanti dotti papillari quanti sono i TDLU. La parte attiva della ghiandola è rappresentata dagli acini, strutture tappezzate da cellule secernenti cubico-cilindriche e circondate dai prolungamenti citoplasmatici degli elementi mioepiteliali appena al di sotto della membrana basale (vedi immagine 1.4). Questi sono organizzati in lobuli e a loro volta costituiscono i TDLU tra i quali si interpone tessuto connettivo e adiposo. Quest'ultimo contribuisce in maniera significativa al volume totale della mammella non secernente. I dotti escretori intralobulari confluiscono in un condotto lobare; i vari condotti lobari, a loro volta, si riuniscono in condotti interlobari o lattiferi, più ampi e meno numerosi, che terminano nel seno lattifero o galattoforo collocato alla base del capezzolo. Dal seno inizia il dotto papillare che percorre il capezzolo e si apre al suo apice con il poro lattifero; nella cagna ce ne sono

Figura 1.3: Particolare di un TEB. Da internet, **Biology of the mammary gland**, <http://mammary.nih.gov/index.html>; 05/01/07.

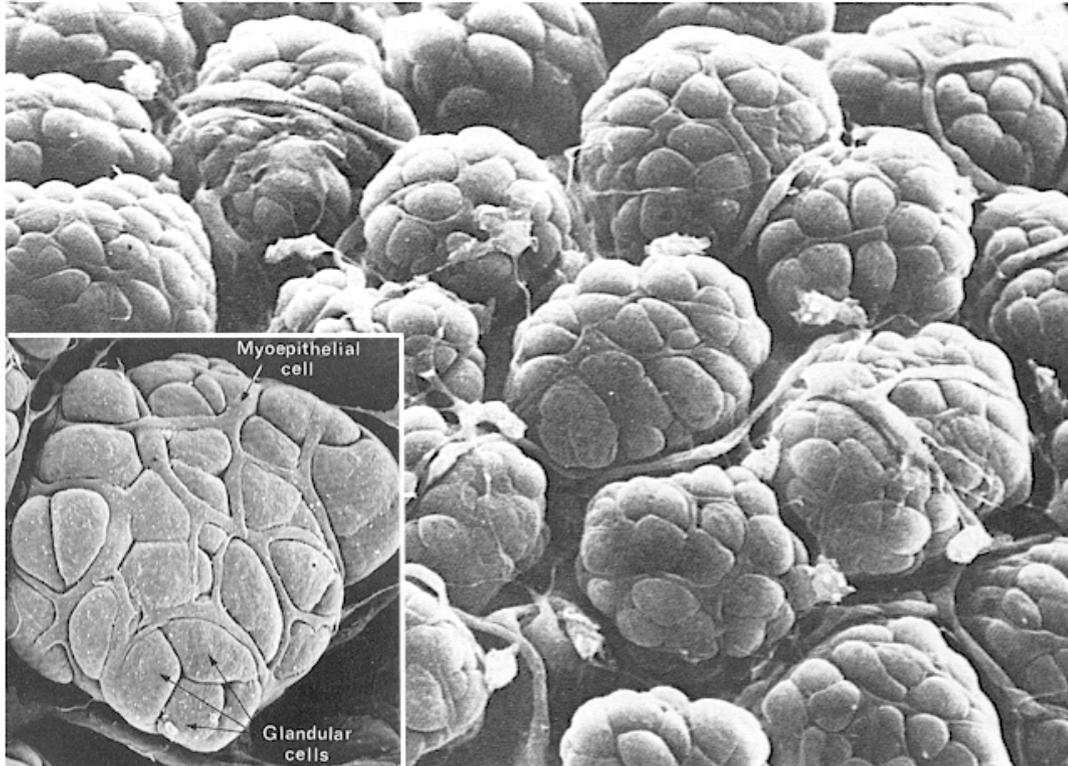


da 6 a 12 per ogni capezzolo.

Nella femmina gravida lo sviluppo mammario accelera rapidamente: durante la prima fase della gravidanza si formano delle gemme che si allungano perpendicolarmente al dotto esistente e formerà i dotti terminali (**alveolar buds**), finché il grasso sottocutaneo non è riempito di queste strutture e allora si formano gli acini. Questa prima fase di iperplasia e ipertrofia ghiandolare, detta mammogenesi, viene regolata da E2, P4, GH e PRL in maniera più o meno diretta; il passo successivo (anche se in realtà sono eventi contemporanei) è la differenziazione cellulare che permette la produzione del secreto mammario o lattogenesi. Pare che l'ormone principalmente coinvolto in questa fase sia la PRL, la cui secrezione al termine della gravidanza, causata dalla caduta del P4, determina la montata latte. Infine, una volta espletato il suo compito, si ha l'involutione del tessuto mammario fino ad una situazione simile a quella di partenza per cui le cellule differenziate devono andare incontro a processi di apoptosi. Lo stimolo più forse in questo senso sembra essere la diminuzione della suzione da parte dei cuccioli.

L'apporto del sangue arterioso ai complessi mammari toracici avviene attraverso i rami mammari dell'arteria epigastrica craniale superficiale (ramo dell'arteria toracica interna); ulteriori rami possono nascere dai segmenti

Figura 1.4: Microfotografia con microscopio elettronico a trasmissione dell'aspetto di un acino mammario. Da internet, **University of Delaware Department of Biological Sciences**, <http://www.udel.edu/Biology/Wags/histopage/empage/efr/efr.htm>; 05/01/07.

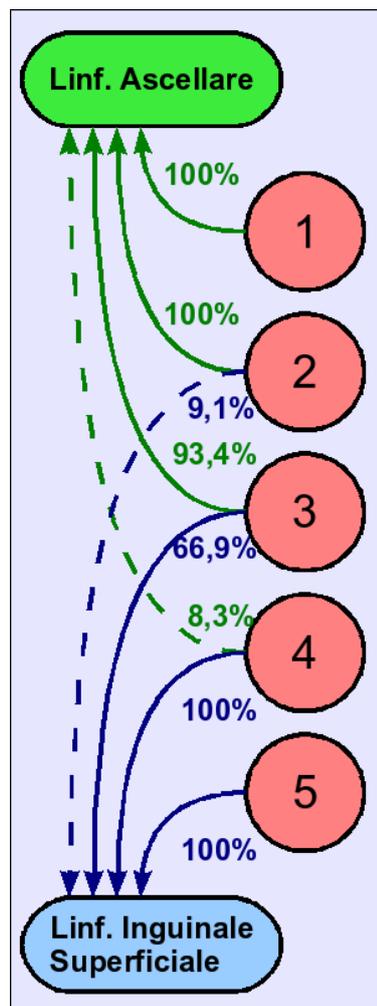


intercostali della toracica interna e dall'arteria toracica laterale. I complessi mammari addominali e inguinali sono tributari dell'arteria pudenda esterna per mezzo di rami dell'epigastrica caudale superficiale.

Il drenaggio venoso delle mammelle toraciche è affidato alla vena epigastrica craniale, che porta il sangue alla vena toracica interna. Le mammelle addominali ed inguinali, invece, portano il loro sangue venoso alla vena pudenda esterna attraverso la vena epigastrica caudale.

La linfa dei complessi mammari toracici raggiunge il linfonodo ascellare omolaterale, mentre la linfa delle altre mammelle arriva al linfonodo inguinale superficiale (o mammario). Questo schema generale subisce delle variazioni individuali per cui: la mammella toracica può drenare anche attraverso il linfonodo cervicale superficiale, la mammella addominale craniale attraverso sia il linfonodo ascellare che l'inguinale superficiale e l'addominale caudale attraverso i linfonodi iliaci mediali (vedi figura 1.5). L'innervazione della ghiandola mammaria è affidata sia a fibre sensitive della cute e dei capezzoli che a fibre nervose del sistema autonomo.

Figura 1.5: Drenaggio linfonodale della ghiandola mammaria del cane. Da Marcato,[87] *modificata*.



Capitolo 2

IL TUMORE MAMMARIO

2.1 Incidenza

Il tumore mammario è la neoplasia più frequente nella cagna intera, rappresentando circa il 50% di tutti i tumori[86] e la seconda neoplasia più importante nella specie canina, preceduta esclusivamente dai tumori cutanei.[32] La reale incidenza del tumore mammario e il rapporto tra le lesioni benigne e maligne è difficile da determinare in relazione al fatto che, i piccoli tumori benigni non sono portati all'attenzione del medico veterinario oppure non sono sottoposti a rimozione chirurgica. Comunque si può stimare, sulla base di criteri istologici e biologici, che l'incidenza sia 105:100.000 e che approssimativamente il 25% delle neoplasie mammarie rimosse siano lesioni di natura maligna.[65, 139] La frequenza di lesioni displastiche, benigne e maligne aumenta spostandosi caudalmente lungo la linea mammaria, inoltre è stato dimostrato come la displasia sia presente prima che le lesioni siano riscontrabili alla palpazione.[161, 174] Infine, una peculiarità della specie canina, è la frequente presenza di tumori multipli, spesso di tipo istologico diverso, nello stesso individuo.

I tumori mammari sono quasi esclusivi delle femmine sebbene siano stati segnalati casi in individui di sesso maschile, dove sono associati ad anomalie ormonali come il **sertolioma** secernente estrogeni.

Dopo correzione in funzione della distribuzione della popolazione, è possibile effettuare un parallelismo tra specie canina e specie umana dal quale emerge come:

- l'incidenza nella cagna sia tre volte più elevata che nella donna;
- il tasso di incidenza cresce con la stessa tendenza in relazione all'età;
- nella cagna il tasso di incidenza continua a crescere con lo stesso andamento esponenziale riscontrato nel gruppo più giovane, a differenza che nella donna.[142]

2.2 Eziologia

2.2.1 Ormoni e fattori di crescita

Steroidi ovarici

Gli estrogeni (E2) e il progesterone (P4) (come brevemente ricordato nella sezione 1.1) sono gli ormoni più importanti coinvolti nel normale sviluppo mammario, ma sono anche i responsabili dello sviluppo tumorale e la durata all'esposizione agli steroidi ovarici durante la vita determina il rischio di sviluppo neoplastico.[91] Infatti, nella cagna, il rischio di sviluppo della patologia viene considerato pari allo 0,5% se viene sterilizzata prima del primo calore, 8% se effettuata prima del secondo calore e del 26% dopo il secondo calore.[143] Questi dati ci suggeriscono un effetto protettivo considerevole dell'**ovariectomia** precoce, ma anche se l'operazione viene ritardata si ha comunque una riduzione del rischio di sviluppo di lesioni benigne.[93] Risulta da indagare ulteriormente il possibile effetto protettivo offerto dall'aver avuto più cucciolate,[161, 17] mentre i dati sugli effetti della gravidanza isterica sono discordanti e non è stata rilevata nessuna relazione tra le irregolarità estrali e il rischio di sviluppo di tumori mammari.[13]

Gli E2 sono considerati promotori cellulari con i **geni regolatori della trascrizione** e alcuni **proto-oncogeni**. [71] Sia i tumori benigni che quelli maligni esprimono i recettori per gli estrogeni (**ER**) e oltre ad essere coinvolti nella trasformazione maligna, rappresentano anche un bersaglio terapeutico nella cagna come nella donna. Il rischio di sviluppo di tumore al seno è influenzato, nella donna, dalla dose cumulativa di E2 biodisponibili e la terapia a base di anti-E2 è una delle più comuni prescrizioni per il trattamento del tumore al seno ER-positivo.[29]

Recenti dati provenienti dal "*The Norwegian Canine Cancer Register*" riportano un'incidenza del 53,3% di tumori maligni mammari nelle femmine di ogni razza canina.[101] Un dato così alto appare essere legato all'ampio uso di **progestinici** per la prevenzione dell'estro che caratterizza il gruppo oggetto di studio. Gli studi condotti sul P4 e sui farmaci progestinici hanno dimostrato la loro azione favorente lo sviluppo tumorale, sebbene non ci sia accordo riguardo alla frequenza con cui le diverse tipologie, displastica, benigna o maligna, si presentino.[157] La letteratura riporta come cani trattati con questi principi attivi sviluppino più facilmente lesioni benigne o abbiano un leggero aumento del rischio per tutte le tipologie tumorali, ma, più recentemente, si è visto che il 91% di cani con tumore mammario trattati con progestinici avevano lesioni maligne, e, addirittura, che a basse dosi questi farmaci avrebbero un effetto protettivo.[91, 157, 94] Gli ormoni steroidei usati a fini contraccettivi sono, in alcune condizioni, associati allo sviluppo di tumori mammari nel cane, nei roditori, nel gatto e nelle scimmie e l'uso prolungato di contraccettivi orali in donne di giovane età è associato ad un aumento del rischio di sviluppo di tumore al seno in età più giovane.[129, 167] Entrambi questi studi sono però in contraddizione con:

- l'affermazione "La caratteristica peculiare del cane è la sua sensibilità ai progestinici nell'induzione di neoplasie mammarie"¹;
- la conclusione per cui "gli studi sui beagle sono inapplicabili al modello umano"². [12]

Ormoni proteici

Il meccanismo d'azione secondo cui il P4 induce i suoi effetti comprende uno stimolo alla produzione di GH da parte della ghiandola mammaria stessa con un effetto probabilmente **autocrino** e/o **paracrino**. [104] Infatti l'ipofisectomia in cagne sterilizzate e trattate con questi principi attivi, non determina una diminuzione significativa della concentrazione di GH nel sangue. La successiva analisi dell'espressione di GH nei vari tessuti ha rivelato che la più alta immunoreattività fosse riscontrata nella ghiandola mammaria, soprattutto nelle aree di epitelio iperplastico TEBs-like (vedi sezione 1.1). [166] Per questi motivi può essere oggetto di speculazione l'ipotesi secondo cui il GH stimoli la proliferazione delle cellule mammarie staminali presenti in queste aree e che questo sia il primo passo del processo carcinogenetico. La produzione ectopica di GH è stata ulteriormente confermata dal calo della sua concentrazione ematica dopo 2 ore da una completa mastectomia e dal riscontro di un gradiente di concentrazione arterovenoso. [145] Risulta utile ricordare che l'espressione del gene che codifica per il GH sia stato dimostrato nel tessuto normale, iperplastico e neoplastico di cane e gatto e, successivamente, anche nella ghiandola mammaria umana sana e affetta da neoplasia. [102, 103] Infine è stato suggerito, da studi sulle caratteristiche morfologiche dell'ipofisi e sui livelli ormonali del siero, che lo squilibrio ormonale di GH e prolattina (**PRL**), possano essere associate a carcinogenesi nel cane, [8] sebbene, le concentrazioni di questi due ormoni determinate a intervalli regolari o in maniera continuativa non abbiano dimostrato differenze significative in cani con tumore mammario benigno o maligno e quelli di controllo, questi ultimi divisi in base all'esposizione a farmaci progestinici. [135, 131]

Il GH ha un effetto diretto ma anche uno indiretto mediato dalle somatomedine o *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1). [104] L'intera famiglia di IGF ha un importante ruolo sia nella normale proliferazione cellulare che nella trasformazione maligna, in particolare IGF-1 si è dimostrata coinvolta nella genesi di diversi tipi tumorali, tra cui quello mammario. [186] Donne con bassi livelli sierici di IGF-1 hanno un rischio minore di sviluppare cancro al seno; [21] topi transgenici con una sovraespressione di IGF-1 sono caratterizzati da sviluppo mammario anormale e aumento dell'incidenza di tumori; IGF-1 interferisce con l'apoptosi ed è un potente mitogeno per molte linee cellulari derivate dal tumore al seno. [55]

Alcuni cani affetti da neoplasia sono più sensibili all'effetto stimolante la secrezione di PRL indotto dall'ormone rilasciante la tireotropina; co-

¹"the uniqueness of the dog in its sensitivity to the induction of mammary neoplasia by progestins"

²"the beagle findings are irrelevant to the human situation"

munque le concentrazioni ormonali negli animali malati non corrispondono necessariamente alla situazione presente al momento della carcinogenesi.[128]

Recettori dei fattori di crescita e loro ligandi

I recettori per gli estrogeni (**ER**), per il progesterone (**PR**), per la prolattina (**PRL-R**) e per l'EGF (**EGF-R**) si trovano nel tessuto mammario normale e neoplastico;[133] inoltre il 40-60% dei tumori benigni o maligni è positivo per ER, PR e PRL-R,[30, 136] per EGF-R,[30] e per i recettori degli **androgeni**.[37] In molte lesioni si riscontra la presenza contemporanea di più recettori ed è stato dimostrato come la positività ai recettori sia più frequente in quelle lesioni in cui sono presenti cellule normali oltre a quelle tumorali, rispetto ai carcinomi "puri".[134]

Il grado di differenziazione dei carcinomi è direttamente proporzionale all'espressione recettoriale e il carcinoma complesso, caratterizzato da una migliore prognosi, è più comunemente positivo a ER e PR rispetto al carcinoma semplice.[30] I carcinomi caratterizzati da alta espressione recettoriale sono associati a tempo di sopravvivenza post-chirurgica più lunga;[89] mentre una correlazione inversa è stata trovata tra ER e l'attività di due enzimi (**glucosio-6-fosfatasi** e **6-fosfogluconato deidrogenasi**) legati alla malignità.[110] Questo comportamento biologico giustifica il motivo per cui il cane viene preso come modello di studio per i tumori ormonodipendenti in medicina umana.[28]

Oltre agli ormoni, proteici e steroidei, la crescita del tessuto mammario normale e neoplastico è influenzata dai cosiddetti fattori di crescita i quali si legano a specifici recettori (*high affinity binding system*) sulle cellule bersaglio. Queste proteine, che fosforilano residui di tirosina o serina/treonina, sono codificate dai geni della famiglia delle chinasi di cui fanno parte molti oncogeni. Molti geni che codificano per tirosin-chinasi, inclusi **c-yes** e **c-erbB-2** (vedi sezione 3.1) sono stati trovati amplificati nel cancro al seno umano.[15, 138, 151] Questi ed altri (**c-myc**, **c-ras**, **RR1**) sono normalmente coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare, ma nella forma mutata promuovono la trasformazione neoplastica.

Il gene **c-yes** si trova espresso in molte cellule epiteliali normali e pare sia responsabile della trasmissione del segnale originato dalla membrana cellulare in ordine alla proliferazione e alla differenziazione cellulare.[117] Il ruolo di questo oncogene nella patogenesi dei tumori mammari non è ancora stato spiegato, sebbene, potrebbe esserci una reazione causale tra la sua attività e la carcinogenesi. L'espressione di **c-yes** è stata trovata nel 40,6% dei tumori mammari benigni e nel 21,3% di quelli maligni.[125]

L'espressione del gene **c-myc** è stata trovata aumentata in 1 di 12 tumori, un carcinoma non differenziato, ma non sono state trovate amplificazioni o altri riarrangiamenti nel locus del gene.[40]

2.2.2 Fattori ambientali

Molti studi su modello animale e di epidemiologia umana hanno dimostrato una correlazione tra fattori dietetici e tumore mammario. Cagne che si dimostravano in stato di nutrizione normale tra i 9 e i 12 mesi di età hanno un rischio di sviluppo della patologia mammaria in questione, significativamente più basso.[152] Inoltre in un gruppo di animali con tumore mammario, una dieta povera di grassi ma ricca di proteine sembra favorire un tempo di sopravvivenza maggiore di una povera di entrambi i principi nutritivi, sebbene le proteine non abbiano nessun effetto se associate ad alte percentuali di grasso.[149] Recentemente uno studio ha confermato come l'obesità ad un anno di vita e una dieta ricca di carne rossa, siano fattori di rischio indipendenti per lo sviluppo di tumori e displasia mammaria.[118] Anche in medicina umana l'obesità e una dieta ricca di grassi sono legati ad un aumento del rischio di cancro al seno, ma, soprattutto per l'obesità, in relazione all'età post-menopausa. Questa particolarità può essere spiegata da molti fattori come l'iperinsulinemia, i livelli più elevati di IGF-1 e più bassi delle globuline leganti gli ormoni sessuali (*Sex Hormone-binding globuline, SHBG*), il cui risultato è un aumento dei livelli di estrogeni liberi e, conseguentemente, un aumento di tumore al seno.[78] Come ricordato brevemente in precedenza (2.2.1), il rischio è legato all'effetto cumulativo degli E2 biodisponibili e una dieta ricca di grassi aumenta i livelli di queste sostanze nel sangue, come dimostrato dalla analisi retrospettiva e dalle meta-analisi di studi indipendenti, e quindi, il rischio di tumore al seno.[78]

L'esposizione ai raggi X non pare correlato con l'incidenza dei tumori mammari ma sembrano anticiparne l'età di sviluppo.[107]

2.2.3 Fattori genetici

I cani di razza pura rappresentano la maggioranza dei soggetti con tumore mammario e questo dato pare legato al coefficiente di consanguineità.[31] Sebbene non ci sia accordo tra gli studiosi e vari da una zona geografica all'altra, Barboncino nano e toy, English Springer Spaniel, Brittany Spaniel, Cocker Spaniel, Setter Inglese, Pointer, Pastore Tedesco, Maltese, Yorkshire Terrier, Bassotto Tedesco e Boxer sono le razze con predisposizione genetica alla patologia.[36]

L'incidenza maggiore di alcune razze suggerisce il coinvolgimento di un fattore genetico, che si pensava fosse la mutazione del gene p53 ("*gene of the year*"), la cui soppressione è un riscontro comune nella donna con cancro al seno. Ma si sono riscontrati fenomeni di resistenza e suscettibilità in linee di sangue di cani beagle indipendenti al gene p53 e c-erbB-2 (p185^{HER2}). Inoltre i fattori genetici agiscono soprattutto sull'età d'insorgenza della patologia ma non sul tipo istologico.[139]

In medicina umana il 50% circa di tutti i tumori e il 20% delle neoplasie mammarie mostrano una proteina p53 mutata mentre il 30-50% delle neoplasie dimostra positività nucleare per p53.[56] La sequenza aminoacidica della proteina p53 del cane ha un'omologia dell'80% con la proteina umana.[18] La

frequenza delle mutazioni è comparabile con il dato disponibile in medicina umana attestandosi intorno al 20% e riguardano i domini proteici altamente conservati come nelle cellule derivate dal tumore al seno.[109, 19] Dai dati raccolti risulta che probabilmente le alterazioni del network di p53 sono coinvolte nella carcinogenesi del cane e potrebbero essere addirittura uno dei momenti precoci di questo processo. In medicina umana, infatti, molti dati suggeriscono che ci sia una mutazione di p53 anche nelle lesioni benigne e preneoplastiche.[92] La mutazione di questo gene è stata correlata con la malignità e una prognosi sfavorevole nel tumore mammario canino.[20] La sovraespressione di p53 sia nel cancro umano che in quello canino benigni sono considerati eventi precoci della carcinogenesi, correlati ad uno stadio preinvasivo della patologia.[112]

Gli studi citogenetici possono rilevare cambiamenti cromosomici associati con l'amplificazione di **oncogeni** e/o la delezione di **oncosoppressori**, purtroppo pochi passi si sono fatti in questo senso. Le mutazioni cromosomiche rilevate sono complesse: una traslocazione in un adenocarcinoma complesso; un isocromosoma in due osteosarcomi; una delezione cromosomica in due lesioni mammarie benigne; varie aberrazioni cromosomiche come delezioni e amplificazioni nelle linee cellulari derivate da metastasi.[95]

L'**aneuploidia** è un fenomeno di frequente riscontro nel tumore mammario (62%), soprattutto nelle lesioni maligne.[119] L'analisi di tumori primari e metastasi non ha rilevato differenze significative nella quantità di DNA,[66] la quale non è comunque relazionata al tipo istologico, al grading nucleare, alla presenza di recettori per gli ormoni steroidei, alla grandezza della lesione o all'interessamento dei linfonodi.[119, 132] Straordinariamente, i tumori maligni più aggressivi del cane, il carcinoma anaplastico e l'osteosarcoma, sono entrambi diploidi o quasi diploidi.[66] Infatti il grado di aneuploidia nel cane è molto più basso di quanto rilevato nel cancro al seno umani.[132]

La **frazione cellulare in fase S** è significativamente più elevata nelle lesioni maligne e anche nei tumori aneuploidi rispetto ai diploidi.[119] In uno studio multivariabile su cani morti per tumore mammario, l'aneuploidia del DNA e l'elevata frazione in fase S sono state associate con una prognosi sfavorevole.[61]

Probabilmente le alterazioni geniche che intervengono nella carcinogenesi sono molte, ma portano a fenotipi convergenti e quindi a lesioni indistinguibili sul piano clinico.

2.3 Patogenesi

Non si conosce molto in relazione all'iniziazione della **carcinogenesi** o agli agenti causali, appare comunque altamente probabile che si tratti di un processo a step successivi, i quali riflettono alterazioni genetiche che portano alla trasformazione neoplastica. Integrando quanto scoperto attraverso lo studio dei tumori umani e dei modelli animali, si intuisce che lo sviluppo tumorale si comporta in un modo formalmente analogo al processo evolutivo

secondo Charles Darwin. Una successione di cambiamenti genetici, ognuno dei quali conferisce uno o più vantaggi dal punto di vista proliferativo, guidano la progressiva conversione delle cellule normali in cellule cancerose.[58] In maniera sintetica e schematica si possono individuare sei alterazioni della fisiologia cellulare che insieme determinano il fenotipo maligno.

- 1 Autosufficienza dai segnali di crescita. Le cellule normali richiedono segnali di crescita (*Growth Signals*) per passare da uno stato quiescente a uno di attiva proliferazione e sembra appurato che nessuna cellula normale possa proliferare in assenza di un qualche tipo di segnale (vedi sezione 3.2.1). Le cellule cancerose riescono a superare questo punto di controllo critico attraverso tre strategie metaboliche:
 - 1.1 alterazioni dei segnali extracellulari;
 - 1.2 alterazioni dei trasduttori dei segnali extracellulari;
 - 1.3 alterazioni dei circuiti intracellulari che trasformano il segnale in risposta biologica.
- 2 Insensibilità per i segnali inibitori della crescita. In un tessuto normale molti segnali antiproliferativi operano per mantenere la quiescenza cellulare e l'omeostasi tissutale. Questi possono agire essenzialmente in due modi distinti:
 - 2.1 le cellule possono essere forzate ad uscire dal ciclo cellulare;
 - 2.2 le cellule possono perdere la loro capacità proliferativa entrando in uno stato post-mitotico di solito associato all'acquisizione di tratti di differenziazione specifici.
- 3 Evasione della morte cellulare programmata (apoptosi). La capacità di una popolazione tumorale di aumentare di numero dipende anche dal numero di queste che va incontro ad apoptosi. Il processo di morte programmata è formato da due classi di componenti, i quali possono andare incontro a cambiamenti che permettono alla cellula cancerosa di diventare "immortale":
 - 3.1 i sensori che sono responsabili del monitoraggio dell'ambiente extra- ed intracellulare;
 - 3.2 gli effettori del processo apoptotico.
- 4 Potenziale replicativo illimitato. Molte e forse tutte le cellule dei mammiferi possiedono un programma autonomo che limita la loro moltiplicazione. Questo servo-meccanismo sembra essere indipendente dai segnali precedentemente considerati e deve essere by-passato dalle cellule cancerose. Il responsabile è la parte terminali dei cromosomi, il telomero. Questa struttura è formata da svariate migliaia di ripetizioni di piccoli elementi di 6 paia di basi (*base pairs, bp*), ad ogni replicazione 50-100 bs sono perse per l'incapacità della DNA-polimerasi di replicare completamente l'estremità 3' terminale durante la fase S. Il telomero protegge

i cromosomi dalle interazioni reciproche che possono portare a fusione degli stessi, alterazioni del cariotipo e in ultima analisi morte cellulare. Un enzima, la telomerasi, si preoccupa di reintegrare le sequenze perse e si trova sovraespressa in molte linee di cellule cancerose.

- 5 Promozione della neoangiogenesi. L'ossigeno e i nutrienti sono essenziali per la sopravvivenza cellulare obbligando le cellule a risiedere a non più di 100 μm da un capillare. La cellula cancerosa deve acquisire la capacità di stimolare la formazione di nuovi vasi sanguigni se vuole crescere in dimensioni.
- 6 Invasione tissutale e metastasi. Il processo attraverso il quale la cellula cancerosa ottiene la capacità per sopravvivere anche al di fuori della lesione primaria non è completamente compreso, ma probabilmente comprende le molecole di adesione cellulare e le proteasi extracellulari.

I carcinomi mammari si sviluppano a partire dai TEBs (vedi 1.1) negli animali giovani; gli adenomi, i fibroadenomi e le cisti si generano dalle strutture più differenziate come gli *alveolar buds* negli animali un po' più anziani. L'effetto protettivo della gestazione e della lattazione sembrerebbe da imputarsi alla differenziazione cellulare di queste strutture.[127] Attività proliferativa elevata delle cellule epiteliali, probabilmente staminali, è stata riscontrata a livello dei TEBs nella donna e nel ratto. Il **medrossiprogesterone acetato**, un progestinico, ha dimostrato di aumentare l'**indice di incorporazione di nucleotidi** a livello di queste strutture nei ratti.[126] Nei cani sottoposti a stimolazione progestinica, la produzione di GH è stata dimostrata nelle strutture TEBs-like, possibile indicatore di una induzione autocrina o paracrina della proliferazione (vedi sezione 2.2.1).[166] L'effetto protettivo dell'ovariectomia e, al contrario, favorente dei progestinici suggerisce che questi ormoni siano coinvolti, forse come promotori, nella carcinogenesi nel cane e nel gatto. Probabilmente anche il GH e altri fattori di crescita prodotti dall'epitelio e dallo stroma hanno un ruolo ausiliario e additivo.

Sebbene non sia certo che esista una progressione tra una lesione preneoplastica e un carcinoma oppure tra un carcinoma ormono-dipendente e uno ormono-indipendente, recenti studi sul ratto e sull'uomo e sul ruolo del GH nello sviluppo di strutture TEBs-simili nel cane, permettono di ipotizzare che la proliferazione delle cellule staminali ormono-indotte, sia una condizione, e forse una lesione, preneoplastica la quale, almeno, aumenta il rischio di sviluppo di un tumore.[127, 166]

Le **lesioni preneoplastiche**, intese come aumento del rischio di sviluppare un tumore da quelle lesioni, sono state trovate in studi di microantomia nelle ghiandole mammarie del cane. La lesione più comune è il **nodulo iperplastico alveolare** (*Hyperplastic Alveolar Nodule, HAN*), la cui frequenza aumenta con l'età. La prova migliore della natura preneoplastica del HAN è la continuità morfologica della lesione con lesioni iperplastiche lobulari molto grandi contenenti foci di trasformazione neoplastica.[14] Foci di cellule atipiche possono essere occasionalmente trovate in alcune lesioni di aspetto benigno, prova che la trasformazione maligna è comunque poco frequente.

Molti geni sono conosciuti per il loro incremento della trasformazione cellulare (TGF- α) o della crescita tramite la sovraespressione (EGF, c-erbB-2) o la sua mutazione (p53) (vedi 2.2.3). L'ipoploidia è stata trovata frequentemente nei carcinomi canini e felini e forse riflette la perdita di geni oncosoppressori.

Il carcinoma in situ rappresenta la più frequente situazione di pre-malignità, ma non è possibile prevedere in che percentuale queste lesioni evolveranno in carcinomi invasivi, rimangano confinate in situ, oppure scompaiano. C'è una ampia evidenza che la proteina **E-caderina**, agisca come molecole sopprimente l'invasione; comunque, come appare da uno studio in vitro di cellule carcinomatose mammarie, pare che l'invasione dipenda anche da altri fattori del microambiente stromale, e non solo l'invasione ma anche la crescita delle cellule tumorali possa essere influenzata da fattori dello stroma.[155]

Le lesioni benigne sono spesso responsive a vari ormoni e presentano un alto numero di recettori per queste sostanze.[175] I carcinomi contenenti recettori per gli E2 e per il P4 sono particolarmente sensibili alla proliferazione indotta dall'estradiolo e dal progesterone.[82] Ci si può aspettare che molti dei carcinomi primari o metastatici che perdono i recettori ormonali, siano ormono-indipendenti; queste potrebbero essere degli ottimi modelli per lo studio della crescita autocrina o paracrina usando siero nel quale siano stati inattivati i fattori di crescita.[165]

2.4 Origine istologica

I tumori mammari del cane sono conosciuti per la loro complessità e l'origine istologica incerta. La disputa del possibile ruolo delle cellule epiteliali basali o delle cellule mioepiteliali nei tumori misti e complessi, interessa sia il medico veterinario che quello umano per lo studio comparativo di neoplasie miste come l'adenoma delle ghiandole salivari.

La maggior parte delle informazioni che abbiamo a disposizione vengono dall'immunoistochimica (IHC), dalla coltura di linee cellulari tumorali e dagli esperimenti di trapianto negli animali da laboratorio (topo nudo o *nude mouse*³). I **filamenti intermedi (cheratina, vimentina, desmina, ecc. . .)** e i **microfilamenti (actina)** studiati attraverso metodiche di IHC, hanno dimostrato come la loro distribuzione sia tessuto-specifica. Inoltre studi con anticorpi monoclonali (**mAb**) ha reso possibile il riconoscimento di diversi isotipi di cheratina, specifici dell'epitelio luminale escretorio e dell'epitelio basale e mioepiteliale (vedi tabella 2.1).

Le cellule mioepiteliali sono state riconosciute come la componente di maggioranza dei carcinomi canini.[26] Cheratina 14 (K14), 17 (K17) e α -actina sembrano essere proprie delle cellule mioepiteliali, ma la presenza della vimentina è controversa.[171, 173] In due studi le cellule mioepiteliali si dimostrarono indubbiamente positive per la vimentina, in un altro leggermente positive e in altro ancora negative. Le cellule mioepiteliali sono considerate essere le

³Individuo mutante caratterizzato dall'assenza di un timo funzionante e quindi da un sistema immunitario deficitario per la quasi assenza di linfociti della linea T

Tabella 2.1: Reattività dei diversi componenti della ghiandola mammaria canina.[26, 53, 63, 171, 173] Da Meuten,[95] *modificata*.

mAb	Epitelio	Epitelio	
	secretorio luminale	basale Mioepitelio	Fibroblasti
Cheratina 4	±	-	-
Cheratina 5+8	+	+	-
Cheratina 7	+	-	-
Cheratina 8	+	-	-
Cheratina 8+18	+	-	-
Cheratina 10	±	-	-
Cheratina 13	-	+	-
Cheratina 14	-	+	-
Cheratina 14+17	-	+	-
Cheratina 18	+	-	-
Cheratina 19	+	+	-
Vimentina	-	±	+
α -actina	-	+	-

responsabili della produzione di laminina, collagene tipo IV e tipo VII, componenti della membrana basale. L'importanza di questa struttura è indubbia considerando che è intatta nella ghiandola mammaria normale e nelle lesioni benigne, discontinua nei carcinomi ben differenziati e mancante in quelli poco differenziati.[116]

Molti studi sono stati compiuti nel tentativo di caratterizzare le cellule fuse e stellate nei tumori complessi e misti e il loro ruolo nella produzione di sostanza ossea o cartilaginea. Sono state, in un primo momento, classificate come cellule mioepiteliali (o cellule a canestro) sulla base di studi al microscopio elettronico e IHC (fosfatasi alcalina), ma non sono mancate le smentite.[122, 160] In un altro studio, la grande maggioranza delle cellule fuse sono α -actina negative, K14 negative e vimentina positive, quindi sembrano più fibroblasti che cellule mioepiteliali.[171] Comunque bisogna ricordare come la trasformazione progressiva da cellule mioepiteliali a cellule di tipo cartilagineo viene fortemente suggerita dalla produzione di collagene di tipo IX da parte di cellule in proliferazione e seguita da cambiamento nell'espressione proprio dei filamenti intermedi, passando da citocheratine a vimentina.[7, 26] Infine l'espressione di molte molecole di adesione (**NCAM** o *Neural Cell Adhesion Molecule*), **tenascina** e **fibronectina** dimostrata in queste cellule, diminuisce in cellule condroblasto-simili e scompare nei condrociti.[6] Ma le cellule nelle fasi precoci della trasformazione in cartillagine, esprime il collagene tipo XI, al contrario la cartillagine matura esprime il collagene tipo II.[5] Un graduale cambiamento da cellule mioepiteliali secernenti mucopolisaccaridi, poi sostanza pseudocartilaginea e infine cartillagine matura, è stato dimostrato in uno studio IHC enzimatico.[122] Infine si deve ricordare che le cellule mioepiteliali

si differenziano completamente solo durante la lattazione, e quindi servono altri fattori per distinguerle dalle cellule staminali eventualmente presenti nel tessuto mammario.[65]

L'espressione contemporanea di diversi tipi di filamenti intermedi (citocheratina, vimentina, desmina, neurofilamenti), comune in molti tumori benigni e maligni, suggerisce una possibile origine da cellule staminali nella maggioranza dei tumori mammari canini.[65, 63] A supporto di tale teoria è stato dimostrato come due linee cellulari derivate da un adenocarcinoma mammario e da un tumore benigno misto hanno la capacità di formare dotti in collagene, uno dei criteri per il riconoscimento di cellule staminali; inoltre formano dotti anche una volta inoculate nel topo nudo e sviluppano tipi diversi di tumore.[59, 60]

In conclusione ci sono quattro ipotesi riguardo all'origine istologica dei tumori misti:

- Cellule staminali;[60, 59, 65]
- Cellule mioepiteliali metaplastiche;[26, 122, 160]
- Cellule epiteliali metaplastiche;[105]
- Cellule connettivali metaplastiche.[171]

I carcinomi mammari canini possono essere suddivisi in luminali o basali a seconda della reattività dei loro sottotipi di cheratina. Una reattività doppia indica un carcinoma non invasivo e probabilmente rappresentano i carcinomi complessi, associati ad una prognosi relativamente favorevole (vedi sezione 2.5).[53] In un altro studio un marker molecolare di trasformazione maligna (citocheratina tipo I 57 KDa) è stata riconosciuta.[4] Il condroitin-solfato è stato spesso trovato intorno a grappoli di cellule carcinomatose ed è inoltre accumulato tra le cellule nell'iperplasia e nei tumori complessi e misti. Da studi di invasione in vitro con due linee di carcinomi mammari canini, si è concluso che TGF- β media la produzione di condroitin-solfato e stimola l'invasione nel gel di collagene.[67]

2.5 Classificazione istologica

Per la classificazione dei tumori mammari possono essere usati principalmente tre metodi:

- Istogenesi;
- Descrizione morfologica;
- Prognosi.

La classificazione secondo l'istogenesi non viene utilizzata per le difficoltà connesse alla determinazione dei tipi cellulari di origine di molte neoplasie, come visto nella sezione 2.4.

La precedente classificazione del WHO[57] era basata sulla descrizione morfologica, ma veniva giudicata “inutilmente complicata”⁴ e veniva aggiunto che “il suo utilizzo sarebbe giustificabile in un futuro in cui i tipi istologici siano correlati con i differenti comportamenti biologici delle neoplasie”⁵. [106] I criteri usati per distinguere i diversi tipi sono stati:

- componenti cellulari coinvolti;
- organizzazione dei componenti cellulari;
- pleomorfismo cellulare ed infiltrazione.

Tabella 2.2: Tabella riassuntiva i principali tipi istologici di tumore mammario del cane in relazione ai tessuti coinvolti. **Legenda:** B: componente benigna; M: componente maligna; nc: non coinvolto; (...): componente che può anche mancare.

Neoplasia	Epitelio luminare	Cellule mioepiteliali	Cellule mesenchimali
Adenoma semplice	B	nc	nc
Mioepitelioma	nc	B	nc
Adenoma complesso	B	B	nc
Tumore misto benigno	B	(B)	B
Carcinoma semplice	M	nc	nc
Carcinoma complesso	M	B	nc
Carcinoma misto	M	(B)	B
Carcinosarcoma	M	(B)	M
Sarcoma mammario	nc	nc	M

Basandosi sui risultati di studi di follow-up, i tumori così divisi sono stati riordinati secondo un grado crescente di malignità aggiungendo l'elemento prognostico a quello morfologico. Il carcinoma infiammatorio, nonostante le sue caratteristiche, non si pone al di fuori di questa classificazione. La sua natura estremamente aggressiva giustifica la risposta infiammatoria e la prognosi negativa.

Viene riportata una tabella riassuntiva 2.2 e una versione ridotta in appendice A.

1 Tumori maligni

1.1 Carcinoma non infiltrante (in situ)

Una neoplasia epiteliale con caratteristiche istologiche di malignità che non ha però attraversato la membrana basale.

La caratteristica essenziale di questo tumore è che le cellule neoplastiche non hanno attraversato la membrana basale delle strutture

⁴“unnecessarily complex”

⁵“its use however may be justified in future, particularly if additional behavioral differences in neoplasms can be related to histological types”

preesistenti. La lesione è sovente multifocale, può crescere in dotti o lubuli preesistenti oppure in cisti o dotti dilatati e di solito non è visibile macroscopicamente. Le cellule tumorali possono essere classificate in molti pattern: cribriforme (“*sieve-like pattern*”), solido con necrosi centrale (“*comedo*”) o senza necrosi centrale, e “*clinging*” (cellule disordinate che coprono la membrana basale). La differenza tra carcinoma in situ ed epiteliosi atipica può essere difficile da mettere in evidenza, specialmente nei tipi a cellule piccole. Inoltre può essere complicato escludere la possibilità di una invasione della parete del dotto o una propagazione intraduttale di un gruppo di cellule carcinomatose da una neoplasia in un'altra zona della mammella, in quest'ultimo caso lo strato di cellule mioepiteliali può essere parzialmente intatto.

1.2 Carcinoma complesso

Un carcinoma comprendente sia cellule epiteliali luminali che componenti mioepiteliali.

Macroscopicamente sono di solito lobulati. Le cellule epiteliali luminali possono essere organizzate in forma tubulopapillare oppure come nodulo solido. Le cellule mioepiteliali, spesso fusiformi, sono frequentemente organizzate in un pattern reticolare o quasi stellato; occasionalmente vi è metaplasia squamosa. La sostanza mucoide intercellulare che si trova occasionalmente, deve essere differenziata dalla cartilagine immatura dei carcinosarcomi, caratterizzati invece da cellule completamente circondate da matrice cartilaginea. La crescita espansiva in forma lobulare è abbastanza comune e l'invasione dei vasi linfatici è infrequente (circa 10%). La differenziazione tra carcinomi complessi altamente differenziati e adenomi complessi può presentare delle difficoltà: l'assenza di una capsula, la crescita infiltrante, l'alta cellularità, la necrosi e l'alto indice mitotico sono indici di malignità. Questo tipo di tumore è relativamente comune nel cane.

1.3 Carcinoma semplice

Un carcinoma comprendente un tipo di cellule rassomigliante le cellule epiteliali luminali o le cellule mioepiteliali.

Sono la tipologia maligna più comune nel cane. La quantità di stroma può variare considerevolmente; i linfociti peritumorali sono comuni, sia in presenza che in assenza di necrosi. Queste lesioni hanno una grande tendenza a infiltrare i tessuti circostanti e i vasi (più del 50%), infatti la disseminazione ematogena e linfatica è comune e la sopravvivenza media è di 10-12 mesi.[97] Basandosi sulla loro differenziazione e il comportamento biologico, possono essere divisi, a seconda della malignità, in: tubulopapillare, solido, anaplastico.

1.3.1 Carcinoma tubulopapillare

Un carcinoma caratterizzato dalla formazione di tubuli e/o proliferazioni papillari.

Questa categoria può essere ulteriormente suddivisa in: carcinoma tubulare senza elementi papillari e carcinoma papillare senza elementi tubulari. Nel cane, il carcinoma tubulare può essere accompagnato da una significativa proliferazione dei fibroblasti stromali. Il tipo papillare, nel quale la componente stromale è di solito scarsa, si presenta frequentemente nel cane e nel gatto. Una variante speciale è il tipo papillare-cistico, di solito ben delimitato, che può essere difficilmente distinguibile dalle lesioni benigne. Metastasi inaspettate di neoplasie cistiche-papillari altamente differenziate ai linfonodi tributari sono state descritte nel cane.[98]

1.3.2 Carcinoma solido

Un carcinoma caratterizzato da una organizzazione di cellule tumorali in strati, cordoni o a forma di nido.

La quantità di stroma varia da poca a moderata, la differenziazione è di solito bassa anche se per alcuni tipi non è così; è comune nel cane. Alcuni carcinomi solidi sono composti da cellule con citoplasma vacuolato, la cui origine è forse mioepiteliale.

1.3.3 Carcinoma anaplastico

Un carcinoma altamente infiltrante di cellule epiteliali pleomorfe che non sono classificabili in una delle altre categorie di carcinoma.

L'aspetto istologico è quello di una neoplasia diffusamente infiltrativa composta da cellule grandi, pleomorfe, spesso con nuclei strani, ricchi di cromatina, alcune multinucleate, da sole o organizzate in grappoli ("cluster"). Sono presenti neutrofili ed eosinofili nel tessuto tumorale, nello stroma e alla periferia; lo stroma reattivo e ricco di collagene è abbondante. Può essere difficile la differenziazione tra carcinomi estremamente anaplastici e sarcomi anaplastici (come il rhabdomyosarcoma). Le cellule del carcinoma anaplastico sono spesso cheratina e vimentina positive all'IHC; le cellule del rhabdomyosarcoma sono positive ai marker delle cellule muscolari come la desmina. Il carcinoma anaplastico può essere differenziato dalle lesioni infiammatorie con macrofagi altamente reattivi attraverso l'IHC, cercando cheratine e marker per gli istiociti come lisozima, α -1-antitripsina. Questo tipo tumorale è abbastanza comune nel cane e viene temuto per la sua tendenza a ripresentarsi e metastatizzare, per questo la chirurgia da sola è altamente criticabile.[97] Viene segnalato anche come riscontro occasionale, in forma di foci, nel tessuto mammario di cani sottoposti a mastectomia per altri tipi di tumori o displasia.

1.4 Tipi speciali di carcinoma

1.4.1 Carcinoma a cellule fusate (spindle cell)

Un tumore maligno composto da cellule fusate che sono organizzate in un pattern epiteliale.

Alcuni dimostrano pattern solido, mentre altri contengono al-

cuni tubuli. La differenziazione tra carcinoma a cellule fusate e fibrosarcoma può essere facilitata dall'uso di colorazioni per le fibre reticolari, le quali si distribuiscono intorno a gruppi di cellule mentre nel fibrosarcoma intorno alle singole cellule, o IHC (citocheratine o vimentina). Pare che la loro origine sia da ricercarsi nelle cellule mioepiteliali. Questo tumore è relativamente raro nel cane.[98]

1.4.2 Carcinoma a cellule squamose

Un carcinoma composto da strati e cordoni di cellule con aree di differenziazione squamosa.

Le cellule basaloidi sono predominanti nelle parti periferiche delle lesioni; la parte centrale, invece, consiste di cheratina lamellare con cellule tumorali necrotiche. La maggioranza dei carcinomi a cellule squamose sono altamente infiltranti e l'invasione dei linfonodi è comune. I carcinomi mammari a cellule squamose, alcuni dei quali originano dal canale del capezzolo, possono essere simili ai carcinomi a cellule squamose che derivano dalla cute e dai suoi annessi, inoltre poiché può contenere numerosi neutrofili, deve essere differenziato dalla metaplasia squamosa di dotti ectasici dovuta a infiammazione. Nei carcinomi, lo strato di cellule più periferico è caratterizzato da atipia e infiltra i tessuti circostanti. Una variante di questo tipo di carcinoma è il carcinoma adenosquamoso che contiene anche strutture ghiandolari. Non è comune nel cane. In questo gruppo viene anche incluso un raro carcinoma che per qualche aspetto ricorda l'adenoma basaloide (*vide infra*), ma con proprietà invasive e metastatizzanti.

1.4.3 Carcinoma mucinoso

Un carcinoma caratterizzato da abbondante produzione di mucina.

Il materiale presente è PAS positivo con o senza diastasi e alcian blu positivo. Non è chiarita l'origine di questa sostanza (cellule epiteliali o mioepiteliali) ma è stato riconosciuto una sua transizione verso un materiale simile alla cartilagine. Questi sono tumori rari che si trovano occasionalmente nel cane e possono essere di tipo complesso o semplice.

1.4.4 Carcinoma lipid-rich

Un carcinoma mammario caratterizzato da cellule con citoplasma abbondantemente vacuolato che contiene grosse quantità di grassi neutri.

Raro nel cane.

- 1.5 Sarcoma I sarcomi mammari rappresentano circa il 10-15% delle neoplasie mammarie del cane.[96] Si presentano come lesioni di grandi dimensioni, spesso sembrano ben demarcate e di consistenza dura. Sono associate a prognosi sfavorevole per l'alta tendenza alla recrudescenza locale e alla metastasi linfonodale e/o polmonare; il tempo di sopravvivenza medio è di 10 mesi.[97]

1.5.1 Fibrosarcoma

Un tumore maligno dei fibroblasti con quantità variabili di collagene.
I tumori di questo tipo sono composti da cellule fusate che producono un reticolo di fibre collagene le cui fibre possono essere organizzate in maniera parallela oppure possono essere disordinate. In alcuni sono state descritte organizzazioni di fibre concentriche intorno ai vasi sanguigni proliferanti, come negli emangiopericitomi. Fibrosarcomi necrotici o emorragici possono essere difficilmente distinguibili da ascessi capsulati o emorragie ma l'area periferica alla lesione suggerisce la diagnosi corretta. I fibrosarcomi e gli osteosarcomi sono i sarcomi mammari più frequenti nel cane.

1.5.2 Osteosarcoma

Un sarcoma caratterizzato da osteoidi e/o formazioni ossee derivanti dalle cellule neoplastiche.

Questi sarcomi sono sia puri che combinati (tessuto osseo, cartilagine e fibroso); questi ultimi sono composti di tessuto osseo e cartilagineo maligno. Inoltre, può essere presente tessuto fibroso maligno e/o tessuto adiposo. Generalmente la matrice è più densa al centro, mentre l'area cellulare è situata alla periferia: il pleomorfismo e l'attività mitotica sono di solito prominenti. Comunque, i sarcomi combinati e le loro metastasi possono essere altamente differenziati.[96] Sono specifici del cane.

1.5.3 Altri sarcomi

Condrosarcomi e liposarcomi puri sono estremamente rari.

1.6 Carcinosarcoma

Un tumore composto da cellule morfologicamente simili a componenti epiteliali maligne (luminali e/o mioepiteliali) e cellule simili a elementi maligni del tessuto connettivo; possono essere rilevate varie mescolanze di componenti carcinomatose e sarcomatose di tutti i tipi.

Macroscopicamente appaiono come lesioni ben circoscritte e di consistenza dura, simile all'osso. Le metastasi sono di tipo misto, sarcomatose o carcinomatose. La maggioranza di questi tumori sono ben circoscritti. Così come il carcinoma complesso, il tempo di sopravvivenza post-chirurgico è relativamente lungo, di media 18 mesi.[97] Questo tipo di tumore non è comune nel cane.

1.7 Carcinoma o sarcoma nei tumori benigni

Tumori con foci di cellule con aspetto di malignità o noduli distinti di cellule di questo tipo presenti in adenomi complessi o tumori misti.

Questi tumori sono stati descritti occasionalmente nel cane. Un esempio è l'osteosarcoma mammario che insorge nel contesto di un tumore benigno misto. Spesso è difficile determinare se la componente maligna è sorta nel tumore mammario o se lo sta invadendo. La malignità può aver largamente sostituito il tumore benigno al momento della diagnosi istopatologica. Non ci sono informazioni sulla prognosi di questi tumori.

2 Tumori benigni

2.1 Adenoma

2.1.1 Adenoma semplice

Una neoplasia benigna di cellule epiteliali luminali o mioepiteliali ben differenziate.

Questi tumori sono composti da cellule ben differenziate di epitelio luminale e sono di tipo tubulare semplice; alcuni dimostrano attività secretoria. Questa lesione è molto rara nel cane. Nel cane, adenomi solidi composti da cellule fusiformi benigne sono detti anche mioepiteliomi.

2.1.2 Adenoma complesso

Un tumore benigno composto da cellule epiteliali luminali insieme a cellule simili alle mioepiteliali.

Può essere associato a fibroadenoma, tumori benigni misti e iperplasia lobulare. La differenziazione tra carcinoma complesso ben differenziato può essere difficile, ma la capsula, l'assenza di necrosi ed atipia e la bassa attività mitotica suggeriscono la benignità. Questi tumori sono comuni nelle cagne. Infine la distinzione tra adenoma complesso intraduttale e papilloma duttale può essere estremamente difficile, poiché elementi epiteliali e mioepiteliali possono essere presenti anche nel papilloma duttale.

2.1.3 Adenoma basaloide (basaloid)

Un tumore benigno composto da cordoni o gruppi di cellule epiteliali basali monomorfe.

Le cellule periferiche sono organizzate a palizzata e appoggiate contro una sottile membrana basale, le cellule localizzate al centro della lesione possono mostrare differenziazione squamosa o ghiandolare. Questi tumori sono riportati esclusivamente nelle cagne beagle sottoposte a somministrazione sperimentale di progestinici.[77] I tumori sono di solito piccoli e circoscritti e non danno metastasi. Una sua controparte che invece da metastasi è stata riconosciuta e viene ascritta ai carcinomi squamosi. Ancora molti studi sono richiesti per una caratterizzazione appropriata delle lesioni basaloidi.

2.2 Fibroadenoma

Un tumore benigno che contiene una mescolanza di cellule luminali epiteliali e cellule stromali; ogni tanto sono presenti anche cellule mioepiteliali.

Possono essere riconosciuti un sottotipo pericanalicolare e uno intracanicolare. Lo stroma del tipo ad alta cellularità può essere estremamente ricco di cellule e figure mitotiche, come il cistosarcoma filloide (*cystosarcoma phyllodes*) nella donna. Il fibroadenoma è abbastanza comune nel cane.

2.2.1 Fibroadenoma a bassa cellularità

2.2.2 Fibroadenoma ad alta cellularità

2.3 Tumore benigno misto

Un tumore contenente cellule di aspetto benigno simili alle componenti epiteliali (luminali e/o mioepiteliali) e cellule mesenchimali, le quali hanno prodotto cartilagine e/o tessuto osseo eventualmente insieme a tessuto fibroso, proprio quest'ultima caratteristica lo distingue dal fibroadenoma. Sono frequenti nelle cagne.

2.4 Papilloma duttale

Un tumore benigno semplice o complesso, ramificato o lobulato, in un dotto ectasico.

Lesione rara nel cane, deve essere distinto dalla papillomatosi duttale che invece è una adenosi con componente intraduttale.

3 Tumori non classificati

- 4 Iperplasia/Displasi mammaria La maggioranza delle proliferazioni epiteliali inizia probabilmente a livello dei dotti terminali e si manifestano come cambiamenti iperplastici di dotti extralobulari (iperplasia duttale) e/o dotti intralobulari (iperplasia lobulare). In alcuni casi, la distinzione tra questi due può essere difficile, se non impossibile. Un'altra lesione lobulare, l'adenosi, è caratterizzata da uno spettro di alterazioni proliferative e regressive del tessuto mammario con rapporti atipici delle cellule epiteliali, mioepiteliali e connettive. La malattia fibrocistica è un complesso di lesioni proliferative e alcune volte degenerative. Questa malattia può includere una o più delle seguenti condizioni: iperplasi epiteliale, adenosi cistica, ectasia duttale, fibrosi e infiammazione. Non è rara nel cane.

4.1 Iperplasia duttale

Una lesione non neoplastica caratterizzata dalla proliferazione intraduttale di cellule epiteliali; alcune volte porta alla parziale o totale oblitterazione del lume. L'iperplasia può essere diffusa o multifocale e viene chiamata anche papillomatosi ed epiteliosi. Le piccole dimensioni e l'uniformità delle cellule e dei nuclei, la mancanza di figure mitotiche e la presenza di uno strato ben riconoscibile di cellule mioepiteliali suggeriscono il comportamento benigno. Quando l'atipia diventa pronunciata si può usare il termine di iperplasia duttale atipica. La distinzione con il carcinoma intraduttale può essere molto difficile. L'iperplasia duttale accompagnata da atipia moderata o marcata, è considerata uno stato pretumorale ed è associato con una probabilità di sviluppo di carcinoma infiltrante maggiore della stessa condizione ma con cellule di aspetto normale.[46]

4.2 Iperplasia lobulare

4.2.1 Iperplasia epiteliale

Una proliferazione di cellule epiteliali all'interno dei dotti intralobulari.

Questo tipo può risultare simile a quanto visto nei dotti extralobulari (papillomatosi o epiteliosi).

4.2.2 Adenosi

Una proliferazione non neoplastica dei dotti.

L'adenosi consiste in varie proporzioni di tessuto epiteliale dei dotti e secernente, mioepitelio e tessuti fibroso. La crescita all'interno dei lobuli può essere intraduttale, periduttale o di entrambi i tipi. Il tipo periduttale cresce specialmente accompagnato da fibrosi (adenosi sclerosante), può simulare un carcinoma infiltrante. La ritenzione di un pattern lobulare e la presenza di un doppio strato di cellule epiteliali-mioepiteliali suggeriscono un processo benigno. Questa lesione è meno frequente nei cani che nella donna.

4.3 Cisti

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

4.4 Ectasia duttale

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

4.5 Fibrosi locale (fibrosclerosi)

La maggioranza delle dispalsie qui descritte mostrano un certo grado di fibrosi. La fibrosi focale può accompagnare l'iperplasia lobulare e la proliferazione duttale.

4.6 Ginecomastia

In questa condizione c'è iperplasia duttale e dello stroma della ghiandola mammaria di un individuo di sesso maschile; possono essere presenti formazioni acinose. Può far parte della sindrome da femminilizzazione in cani associati a sertolioma testicolare.

2.6 Segni, sintomi clinici e diagnosi

Tipicamente i cani affetti da neoplasie mammarie sono anziani, 9-11 anni, di sesso femminile, interi o che sono stati sottoposti a ovariectomia in età già adulta.[48] Di solito il primo manifestarsi della patologia è il riscontro di formazioni nodulari su una o più mammelle. La scoperta può essere fatta dal proprietario oppure dal medico veterinario durante una visita routinaria; infatti, quando la lesione si rende manifesta alla palpazione, i pazienti sono clinicamente in salute. Il periodo dall'inizio dei segni clinici alla morte può essere estremamente variabile, da pochi giorni a molti mesi perché dipende dal tipo tumorale che influisce sull'aggressività e quindi sulla prognosi.[120]

La localizzazione metastatica è caratterizzata da sintomi di malattia sistemica, affaticamento, letargia, dimagrimento; la gravità di questi dipende dalla localizzazione e dall'estensione della lesione. La presenza o meno della neoplasia primaria non esclude la metastasi, considerato che queste si rendono manifeste nell'arco dell'anno successivo alla mastectomia.[143] Il carcinoma infiammatorio si presenta con sintomi più drammatici: infiammazione estesa che coinvolge la ghiandola mammaria con edema e dolore, motivo per il quale può essere confuso con una mastite; debolezza; dimagrimento: poliuria e polidipsia; alta incidenza di metastasi ai linfonodi e ai polmoni. La prognosi è infausta con un tempo di sopravvivenza medio di 25 giorni dalla diagnosi.[120]

Il primo passo del clinico è l'effettuazione di tutti quegli esami che gli permettono di avere uno staging completo della patologia e in particolare:

- valutazione della lesione primaria (dimensioni, tipo, esame istologico);
- stato dei linfonodi tributari;
- radiografia toracica;
- profilo emobiochimico completo;
- esame delle urine.

Il fine è valutare lo stato generale di salute e determinare l'estensione del tumore, inoltre i risultati danno importanti dati prognostici che possono influenzare la decisione del proprietario sul trattamento da eseguire e per organizzare lo stesso in maniera razionale.

L'aspetto con cui si presenta il tumore primario dipende dal tipo e dal tempo trascorso dalla sua insorgenza; ci troveremo, quindi, di fronte a lesioni grandi, piccoli, ulcerate, infiltrate nei tessuti circostanti o ben circoscritte e in una o più ghiandole. Come ricordato nella sezione 2.1, le ghiandole caudali sono più frequentemente interessate delle craniali, ma la posizione non influenza la prognosi. La presenza di più tumori, evenienza di frequente riscontro (60% dei casi), obbliga il medico veterinario a sottoporre tutte le lesioni a biopsia perché potrebbero essere di tipi istologici diversi; comunque la presenza di più lesioni non influenza la prognosi.[10] Sebbene alcuni segni clinici, come la rapida crescita, la dimensione della lesione, la presenza di ulcerazioni e la fissità alla cute e ai tessuti circostanti, possano suggerire un fenotipo maligno del tumore, è spesso impossibile discriminare il comportamento biologico della neoplasia in base alle sole osservazioni cliniche, specialmente nel cane. L'esame citologico non sempre può aiutare, l'accuratezza è del 19%, la sensibilità del 65% e la specificità del 94%, anche se le irregolarità cromatiniche sono segnalate come un significativo criterio di malignità[3] e i campioni così ottenuti e quelli provenienti da biopsia potrebbero essere usati per la determinazione della quantità di DNA, marker più affidabile dei precedenti.[62]

Il metodo migliore (gold standard) per fare diagnosi, determinare tipo tumorale e prognosi, è l'esecuzione di una biopsia incisionale preoperatoria e postoperatoria seguita da esame istopatologico e valutazione dei margini

di escissione nel campione postoperatorio. Il rapporto tra tumori di aspetto istopatologico maligno o sospetti e quelli che hanno dato realmente metastasi varia da 10:1 a 2:1 a seconda degli studi.[11] Le cause di questa discrepanza sono molteplici e non sempre controllabili:

- struttura disordinata caratteristica dei tumori complessi;
- aspetto di pseudo-infiltrazione dovuto al sequestro di tessuti epiteliale in tessuto fibroso reattivo o in osso o cartilagine;
- presenza di foci di alta attività mitotica;
- atipia nucleare;
- metaplasia squamosa.

L'errore diagnostico si attesta intorno al 10%.[57]

Il fenotipo maligno è spesso accompagnato da un qualche grado di infiltrazione o crescita distruttiva nei confronti dei tessuti circostanti e/o invasione vasale e distruzione della membrana basale; i tumori benigni mancano di questa componente distruttiva e spesso sono capsulati.[9] La necrosi è più frequente nelle neoplasie maligne, come le figure mitotiche e l'aneuploidia.[64, 132] Anaplasia (perdita di differenziazione), anisocitosi e anisocariosi sono caratteristiche delle lesioni maligne mentre il polimorfismo (la presenza di vari tipi cellulari spesso non organizzati) può essere osservato sia nei tumori benigni che maligni, complessi, misti dei cani.

Lo stato dei linfonodi regionali ha un forte impatto sulla sopravvivenza dei pazienti, per questo dovrebbero essere valutati sempre.[61, 181] I linfonodi tributari possono essere normali o aumentati di dimensioni (10-50% dei casi);[120, 181, 99] il coinvolgimento metastatico è stato trovato nel 50% dei casi di cani sottoposti a mastectomia regionale.[100] I metodi per la loro valutazione sono: la palpazione, l'ago aspirato, la biopsia e l'escissione dell'intero linfonodo. Studi in pazienti con cancro al seno hanno dimostrato che l'esame fisico da solo è inaccurato nel determinare il coinvolgimento del linfonodo ascellare perché un suo aumento di dimensioni potrebbe essere dovuto a cause infiammatorie e, al contrario, dimensioni normali non escludono una localizzazione metastatica.[42]

In medicina veterinaria uno studio sulla sensibilità e la specificità di questi metodi ha portato a risultati simili. La palpazione è inaccurata nel predire la metastasi, ma la citologia è un metodo più accurato con una sensibilità del 100% e una specificità del 92%.[79] Sebbene in questo studio si prendano in considerazione cani con differenti tipi di tumori, sembra ragionevole pensare che la citologia abbia un'accuratezza simile anche nei tumori mammari. Un ago-aspirato è di solito semplice da effettuare, non è invasivo, non richiede sedazione e genera risultati veloci e predittivi, per questo la valutazione citologica dei linfonodi regionali dovrebbe essere effettuata come screening iniziale in tutti i cani con tumori mammari. Se la citologia da esito positivo o dubbio può essere considerata l'eventualità di una completa escissione la quale non

è certo se possa aumentare il tempo di sopravvivenza dei pazienti, ma può aumentare il controllo a livello regionale del tumore e prevenire i sintomi associati al progressivo aumento di dimensioni del pacchetto linfonodale.[176] L'organizzazione del drenaggio linfonodale è stato descritto nella sezione 1.1.

Il profilo ematico è di solito normale a meno che non ci siano patologie concomitanti o variazioni non specifiche legate all'età dell'animale. Un recente studio mirato a valutare i cambiamenti del profilo emostatico in cani con tumore mammario ha trovato che i due terzi del campione esaminato avevano anomalie dell'emostasi con un aumento dell'incidenza in cani allo stadio III e IV della malattia. Di questi sono più facilmente affetti da coagulopatie quelli con metastasi, tumori invasivi o localmente infiltrativi, necrosi tumorale e carcinoma infiammatorio. Comunque il significato clinico di queste anomalie non è chiaro.[156] L'ipercalcemia legata alla malignità è una frequente complicazione nel cancro alla mammella nella donna. Questa manifestazione paraneoplastica può essere causa di lesioni metastatiche alle ossa ad azione osteolitica oppure alla produzione di *Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP)* da parte delle cellule tumorali. Questo riscontro clinico è raro nel cane.

Tutti i cani con tumore mammario maligno dovrebbero essere sottoposti a radiografia toracica in duplice proiezione, essendo ancora il metodo diagnostico standard per la valutazione delle metastasi polmonari nei pazienti veterinari. Una radiografia convenzionale può individuare lesioni polmonari del diametro di 6-8 mm. La probabilità di individuare lesioni precoci può essere aumentata usando la TAC che consente di individuare le metastasi di circa 4 mm. La rilevazione precoce e la possibilità di trattamento delle lesioni metastatiche precoci, può avere influenza nella risposta e nello sviluppo della patologia e quindi la TAC è diventata il metodo di valutazione standard in medicina umana per la valutazione delle metastasi polmonari.[47] Il riscontro di malattia metastatica polmonare al momento della diagnosi del tumore primario varia dal 35% al 6%.[181] I cambiamenti in medicina veterinaria hanno portato ad una diagnosi sempre più precoce e quindi una sempre maggior possibilità di cura, almeno potenzialmente. Cani con segni di malattia aggressiva dovrebbero essere sottoposti a radiografia toracica prima della escissione chirurgica della lesione primaria, il cui risultato può modificare la decisione di una operazione più o meno estesa e modificare la prognosi in senso spiccatamente negativo. I polmoni sono il sito di metastasi più comune nel cane con tumore mammario maligno ma altre localizzazioni sono state segnalate e vanno valutati con cura segni clinici e caratteristiche individuali; in questi casi possono essere indicate la radiografia e l'ecografia addominali.

Una volta recuperati tutti questi dati, i tumori mammari possono essere stadati secondo il sistema TNM del WHO o derivati,[179] dove T sta per le dimensioni del tumore primario, N descrive il coinvolgimento dei linfonodi regionali, M indica la presenza di metastasi (vedi tabella 2.3).

Tabella 2.3: Stadiazione clinica dei tumori mammari del cane modificata[179] (con esclusione del carcinoma infiammatorio). Da Sorenmo,[153] *modificata*.

T: Tumore primario	Classificazione		
T ₁ diametro < 3 cm	Stadio		
T ₂ diametro tra i 3 e i 5 cm	I	T ₁	N ₀ M ₀
T ₃ diametro >5 cm	II	T ₂	N ₀ M ₀
N: Stato dei linfonodi tributari	III	T ₃	N ₀ M ₀
N ₀ nessuna metastasi	IV	T _n	N ₁ M ₀
N ₁ metastasi	V	T _n	N _n M ₁
M: Metastasi sistemica			
M ₀ nessuna metastasi			
M ₁ metastasi			

2.7 Comportamento biologico e prognosi

Non esistono in letteratura, dati pubblicati di rilievo che descrivano il decorso clinico di cagne con tumore mammario non trattate. Studi di follow-up hanno, invece, comparato la prognosi di animali con tumori mammari benigni, carcinomi in situ e carcinomi infiltranti.[46, 61] L'ultima categoria ha, come ci si può aspettare, una sopravvivenza post-chirurgica significativamente più breve.

La prognosi è spesso espressa come la percentuale di animali sopravvissuti per 1 o 2 anni dopo la mastectomia iniziale e risulta variabile tra il 25 e 40% a seconda degli studi. La mera sopravvivenza è comunque un marker che può essere influenzato da fattori indipendenti la patologia mammaria, è stato quindi scelto come indice più utile e razionale, l'intervallo libero da malattia post-chirurgico (55%).[46]

La causa di morte più importante, in cani dopo mastectomia, è considerata la metastasi (75/178 casi) e la dispnea (n=45) ne è il più importante segno clinico. Il coinvolgimento di organi distanti (fegato, ossa) e pleura senza il coinvolgimento dei polmoni (*bypassing*) è abbastanza infrequente; come lo è il by-pass dei linfonodi tributari.[100] I polmoni e queste stazioni linfonodali sembrano funzionare come "filtri" alla disseminazione delle cellule cancerose. La recrudescenza locale (39/178) e altre malattie concomitanti (63/178) sono altre cause di morte di significativa importanza.

Molti fattori prognostici sono stati identificati nei cani con tumori mammari come:

- l'età;
- le dimensioni e lo stadio del tumore;
- il comportamento biologico;
- il tipo istopatologico e il relativo grading;
- la presenza di recettori per gli estrogeni;

- la densità dei microvasi;
- le alterazioni genetiche.

Un'età avanzata al momento della diagnosi è stata riportata avere un effetto prognostico negativo in molti studi veterinari, e anche nella donna si riscontra una diminuzione della sopravvivenza e remissione della patologia all'aumentare dell'età.[61, 178] Comunque, l'età non è di solito associata con una maggiore o minore malignità e quindi non può essere considerata un fattore negativo in se stesso. Pare piuttosto che questi dati siano da collegare, soprattutto in medicina umana, ai limiti imposti alla terapia antitumorale nei pazienti geriatrici per evitare effetti tossici, che si riflettono su una minore efficacia della cura, ma non è un problema della sola neoplasia mammaria; inoltre si deve considerare che il paziente anziano possa morire per cause diverse dal tumore.[50]

La dimensione tumorale è stata dimostrata essere un fattore prognostico indipendente in molti differenti studi.[99, 181] I tumori con diametro inferiore ai 3 cm sono associati ad una prognosi nettamente migliore di quelli di più di 3 cm. Le informazioni riguardanti le dimensioni dovrebbero essere sempre valutate vista la semplicità nel reperirle per decidere una eventuale terapia adiuvante.

La stadiazione usando il sistema TNM del WHO o i suoi derivati (vedi tabella 2.3) danno importanti informazioni prognostiche secondo diversi studi. Come molti altri tumori solidi, quelli mammari sono associati ad una prognosi peggiore tanto più sono avanzati.[181] Cani con metastasi linfonodale (stadio IV) hanno una aspettativa di sopravvivenza più corta di quelli con stadio linfonodale negativo e cani con metastasi (stadio V) hanno una prognosi peggiore di quelli con staging inferiore o solo metastasi ai linfonodi tributari.

Il tipo tumorale, la differenziazione istologica e il grading istologico sono importanti fattori prognostici. In generale cani con sarcomi mammari hanno una prognosi peggiore di quelli con tumori epiteliali, tranne di quelli con carcinoma infiammatorio; i sarcomi primari sono associati a metastasi ematogene precoci e un'alta incidenza di recrudescenza.[61] Il sistema di classificazione istopatologica del WHO viene appunto ordinato con un criterio di malignità crescente, come viene spiegato nella sezione 2.5.

Nei tumori mammari canini, e soprattutto in quelli felini, viene usato un sistema di grading istologico che quantifica l'anaplasia, la formazione di tubuli, l'attività mitotica e l'anisocoriosi. La somma dei punteggi individuali determina il grado di malignità istologico ed ha significato prognostico a differenza delle singole voci che lo compongono, le quali, invece, non ce l'hanno. L'indice mitotico è chiaramente correlato con il punteggio ottenuto nella valutazione del nucleo.[121] (vedi tabella 2.4)

Inoltre ci sono altre caratteristiche da valutare:

- l'infiltrazione nella cute e nei tessuti molli;[17]
- l'invasione vasale;[17]

Tabella 2.4: Sistema di grading istologico per i carcinomi mammari del cane. Da Meuten,[95] *modificata*.

Caratteristiche	
Formazione di tubuli.	
1	Formazioni tubulari ben definite nella sezione
2	Aspetto intermedio
3	Pochi o nessun tubulo
Nucleo ipercromatico e mitosi.	
1	Pochi nuclei ipercromatici o poche figure mitotiche per campo ad alto ingrandimento
2	Due o tre delle figure precedentemente descritte
3	Più di tre figure
Anisocoriosi e deformità nucleari	
1	Nuclei abbastanza uniformi in dimensioni, forma e colorazione
2	Aspetto intermedio
3	Anisocoriosi e deformità nucleari marcate
Valutare le singole caratteristiche e sommare i punteggi per determinare il grado di malignità istologica.	
Punteggio	Grado di malignità
3-5	I
6-7	II
8-9	III

- l'elevata frazione in fase S;[61]
- la presenza di una risposta infiammatoria;
- gli indici di proliferazione cellulare **AgNOR** (regioni argentaffini dell'organizzatore nucleolare) e **PCNA** (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*);[27, 121]
- il coinvolgimento dei linfonodi regionali[61, 181]
- una dieta ricca di proteine e grassi.[149]

Lo sviluppo della maggioranza dei tumori mammari dipende dalla presenza di E2 e la maggioranza dei carcinomi canini esprime ER (vedi sezione 2.2.1). Esiste una relazione inversa tra l'espressione di ER e la differenziazione istologica: i tumori benigni e quelli ben differenziati sono di solito ER positivi, al contrario quelli poco differenziati e anaplastici sono ER negativi. L'espressione di ER è stato anche associato allo stato ormonale del cane: cani giovani e interi hanno tumori più facilmente ER positivi che cani più vecchi e sterilizzati.[111]

Inoltre si può predire la risposta alla terapia ormonale: pazienti ER positivi più facilmente rispondono all'ablazione estrogenica o al blocco dei ER. L'espressione di ER è tradizionalmente valutata tramite **DCCA** (*Dextran-Coated Charcoal Biochemical Assay*) ma può essere valutata anche tramite IHC su tessuti incluso in paraffina conservando la stessa predittività; inoltre questa metodica è più semplice, sicura ed economica.[90]

L'angiogenesi è fondamentale per la crescita e le metastasi della maggioranza dei tumori solidi. Livelli sierici elevati di vari fattori tumorali stimolanti l'angiogenesi e l'evidenza istopatologica di un incremento nella neovascolarizzazione, misurata come **densità dei micro-vasi**, sono stati riportati avere importanza prognostica nel tumore al seno umano e altri tumori solidi. La densità dei microvasi è stata riportata come un importante fattore prognostico indipendente in donne con cancro al seno senza coinvolgimento linfonodale. La densità dei microvasi è stata trovata correlata anche nei tumori mammari canini con la malignità, infatti hanno una neovascolarizzazione maggiore dei benigni. Aumenta anche il rischio di recrudescenza locale, le metastasi linfonodali e la differenziazione istologica in molti studi. Oltre all'importanza prognostica, questi test sui fattori angiogenici potrebbero avere un risvolto terapeutico con sostanze che fermano l'angiogenesi.[123]

Alterazioni molecolari, come mutazione di p53 e sovraespressione di c-erbB-2 sono associate con un fenotipo più maligno e prognosi peggiore in donne con cancro al seno. La sovraespressione e la mutazione di p53 sono stati valutati in differenti studi veterinari. I risultati sono comunque discordanti. In alcuni studi le differenze tra cani con mutazioni a questo livello e cani senza mutazioni sono state poche, in altri si vede un significativo aumento del rischio di recrudescenza e morte e inoltre una correlazione tra p53 mutazioni e il grading istologico alto.[41, 125, 172]

Un riassunto dei principali fattori prognostici del cane e della donna è presentato in tabella.2.5

Tabella 2.5: Fattori prognostici nel cane e nella donna. Da Meuten,[95] *modificata*.

Fattori prognostici	Donna	Cane
Posticipo della chirurgia	-	-
Localizzazione	-	±
Staging clinico del tumore primario	+	+
Dimensioni del tumore	+	+
Tipo istologico	+	+
Grado istologico di malignità	+	+
Tipo di crescita (infiltrazione)	+	+
Trattamento chirurgico		-
Coinvolgimento linfonodale	+	-

2.8 Trattamento

La chirurgia rimane il trattamento di elezione nel cane per la maggioranza dei tumori; fanno eccezione quelli inoperabili (carcinoma infiammatorio) o quelli con metastasi polmonari o viscerali conclamate. Dopo l'escissione chirurgica viene fortemente suggerito l'esame microscopico. Ritardare la scelta chirurgica può portare ad altre complicazioni come le dimensioni maggiori che comportano una maggior difficoltà alla rimozione.

L'estensione della chirurgia dipende da molti fattori come:

- la dimensione della lesione;
- il grado di infiltrazione;
- la localizzazione (drenaggio linfatico);
- il numero;
- lo stato dei linfonodi tributari;
- l'età del paziente;
- la volontà del proprietario.

La nodulectomia dovrebbe essere consigliata solo nel caso di lesioni molto piccole (< 5mm), di consistenza dura e ben delimitate, mentre è sconsigliata nei casi di lesioni multiple o di qualsiasi segno di malignità. La mastectomia semplice è indicata se ci si trova di fronte ad un singolo tumore nella prima toracica, poiché non esistono connessioni linfatiche con le altre ghiandole (vedi sezione 1.1). La nodulectomia e la mastectomia semplice hanno un rischio aumentato di recrudescenza locale, in confronto alla mastectomia regionale e all'escissione dell'intera linea mammaria se il tumore è maligno e ha invaso il sistema linfatico.[130]

La mastectomia regionale viene considerata per quei cani in cui il tumore ha coinvolto le ghiandole inguinali e addominali o la toracica caudale. Se ci sono tumori multipli o sospetti di malignità (infiltrazione, ulcerazione), viene consigliata l'escissione dell'intera linea mammaria (mastectomia totale), soprattutto perché le connessioni linfatiche tra ghiandola addominale e toracica sono state dimostrate nel 10% dei cani.

Durante la rimozione dell'ultima ghiandola, sia nella mastectomia regionale che totale, viene rimosso anche il linfonodo inguinale superficiale. Viene raccomandata sia per l'intima connessione esistente tra questo pacchetto linfonodale e l'ultima mammella, ma anche per la possibilità che le cellule neoplastiche siano già nel sistema linfatico o nel linfonodo tributario (circa 50% dei casi).[100] Il linfonodo ascellare superficiale viene rimosso solo se vi è un sospetto clinico o citologico di invasione. La mastectomia totale e la rimozione di entrambi i linfonodi tributari viene indicata solo nei casi di tumori mammari multipli bilaterali, poiché il drenaggio è ipsilaterale. Un riassunto delle linee guida consigliate è riportato in tabella 2.6. Purtroppo l'assenza di metastasi

Tabella 2.6: Linee guida di trattamento proposte per il tumore maligno del cane basate sulle dimensioni tumorali, lo staging, il tipo istologico e la differenziazione. Da Sorenmo,^[153] *modificata*.

Dimensioni	Stage	Tipo	Istopatologia	Trattamento
<3 cm	1	Carcinoma	Ben differenziato Tubulare/Papillare	Escissione completa Ovariectomia
<3 cm	1	Carcinoma	Non differenziato	Escissione completa Ovariectomia Chemioterapia
>3 cm	2-3	Carcinoma	Qualsiasi	Escissione completa Ovariectomia Chemioterapia
Qualsiasi	4	Carcinoma	Qualsiasi	Escissione completa includendo i linfonodi tributari Ovariectomia Chemioterapia
Qualsiasi	5	Carcinoma	Qualsiasi	Chirurgia e chemioterapia solo palliative
Qualsiasi	Qualsiasi	Carcinoma	Inflammatorio	Chirurgia +/- Trattamenti palliativi Analgesici, antinfiammatori Chemioterapia
Qualsiasi	1-3	Sarcoma Carcinosarcoma	Qualsiasi	Escissione completa a margini ampi Radioterapia se la rimozione è incompleta Chemioterapia

rilevabili al momento dell'operazione non protegge dalla possibilità che si sviluppino o si siano già sviluppate micrometastasi.

Capitolo 3

OGGETTO DELLA VALUTAZIONE

3.1 Oncogene c-erbB-2

Nell'uomo **HER2**, o c-erbB-2 se ci riferisce al gene, è un proto-oncogene situato sul cromosoma 17q21 che codifica per una glicoproteina transmembrana di 1255 amminoacidi e di 185 kDa detta p185^{HER2} o più semplicemente HER2 protein o recettore HER2.[2] Nel cane (*Canis familiaris*) si trova sul cromosoma 9 ha una omologia del 92% con il gene umano e codifica per una proteina di 1259 aa il cui peso molecolare è 137 kDa.

Descritto nel tumore mammario del cane, la sua espressione si trova nel 50% dei tumori benigni, semplici e complessi, e nel 19,1% degli adenocarcinomi.[125] Anche se altri studi confermando i dati relativi alle lesioni maligne, smentiscono quelli relativi alle lesioni benigne trovandoli tutti negativi.[35] I valori di c-ErbB-2 sono, comunque, confrontabili con quelli dei tumori al seno umani maligni (20-30%), dove l'amplificazione di questo gene è associata con comportamento clinicopatologico più aggressivo, resistenza o sensibilità a particolari protocolli chemioterapici e ormonali.[137] Nella maggioranza dei carcinomi al seno, l'amplificazione genica e la sovraespressione del prodotto proteico a partire da una singola copia del gene sono conservate durante la progressione tumorale.[74] Ne viene suggerito che l'espressione di c-ErbB-2:

- possa essere attivato durante le fasi iniziali dello sviluppo tumorale;[141]
- sia coinvolto nella trasformazione maligna;
- possa essere usato come indicatore prognostico.[1]

I molti nomi di questo oncogene dipendono dalla scoperta di altrettanti geni omologhi coinvolti in patologie diverse:

- "Neu", isolato in cellule di neuroblastoma di ratto e successivamente in cellule normali di ratto e uomo;[182]
- "erB", eritroblastoma nei polli;[170]

- HGFR o HER nell'uomo.[2]

Fa parte dei recettori raccolti sotto il nome di **ErbB** che appartiene alla prima subclasse della superfamiglia dei recettori con capacità tirosin-chinasica (*receptor tyrosine kinase*, **RTK**). I quattro membri del gruppo ErbB sono:

- **HER1/EGFR/ErbB1;**
- **HER2/Neu/ErbB2;**
- **HER3/ErbB3;**
- **HER4/ErbB4.**

Tutti hanno in comune un dominio extracellulare con il sito di legame per il ligando ricco di residui di cisteina, una singola catena transmembrana lipofila e un dominio intracellulare con attività tirosin-chinasica. I ligandi vengono detti fattori di crescita peptidici correlati a EGF (*EGF-related peptide growth factor*), legano il dominio extracellulare di ErbB stimolando la formazione di omo- ed eterodimeri. La dimerizzazione stimola l'attività chinasica intrinseca dei recettori e permette l'autofosforilazione di specifici residui di tirosina nel dominio intracitoplasmatico. Questi residui fosforilati rendono attivi e/o disponibili siti per le molecole intermedie coinvolte nella cascata di segnali intracellulare i quali, influenzando l'espressione genica, daranno la risposta biologica. Gli ErbB sono stati dimostrati in molti tessuti di origine epiteliale, mesenchimale e neuronale dove giocano un ruolo fondamentale dei processi di sviluppo, proliferazione e differenziazione; mentre una loro espressione disordinata, soprattutto per quanto riguarda HER1 ed HER2, è implicato nello sviluppo e nella trasformazione maligna di molti tipi di neoplasie.

Il capostipite della famiglia ErbB si riscontra in *Caenorhabditis elegans* (un nematode) come una singola combinazione ligando/recettore; in *Drosophila* (un artropode) il sistema comincia ad essere più complesso con un recettore e 4 ligandi, e nei vertebrati trova la sua forma definitiva dove per 4 recettori ErbB ci sono molti ligandi EGF correlati.[115] Di conseguenza, sono possibili numerose combinazioni di omo- ed eterodimeri, suggerendo che negli animali superiori, il gruppo di recettori si sia evoluto per rispondere ad una grande varietà di segnali, capacità che potrebbe essere necessaria all'evoluzione dei metazoi. Il network multistrato trovato negli organismi superiori permette l'interazione di molti ligandi, recettori, effettori e fattori di trascrizione, e un alto grado di adattabilità e diversificazione del segnale, con molti livelli di controllo biologico della risposta.[88]

L'importanza di ErbB nell'embriogenesi e nello sviluppo dei vertebrati è stata dimostrata dall'analisi di topi knockout geneticamente modificati, nei quali si ha mortalità embrionale o perinatale.[81] Anche nell'individuo adulto giocano un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi tissutale e, come nella ghiandola mammaria, dove la proliferazione e la differenziazione avvengono soprattutto nel periodo postnatale (vedi sezione 1.1). In questo tessuto tutti e quattro i componenti del gruppo ErbB sono espressi nelle cellule,

con prevalenza di uno rispetto all'altro in funzione del tipo cellulare e dello stadio fisiologico.[24] In particolare pare che HER1 sia coinvolto nello sviluppo ghiandolare stimolando la crescita duttale mentre HER2 e HER4 sembrano avere un ruolo fondamentale nella differenziazione lobuloalveolare e nella lattogenesi.[177]

Negli ultimi anni sono stati oggetto di studio intensivo anche a causa del fatto che sono stati i primi esempi di integratori di segnali, capaci cioè di interagire con recettori di membrana di classi diverse attraverso essenzialmente due meccanismi:

- la fosforilazione da parte di altri recettori;
- l'autofosforilazione per l'aumento dell'attività chinasi.

Un esempio del primo caso coinvolge il recettore per la PRL, il quale manca di attività chinasi propria e coinvolge la tirosin-chinasi Janus 2 (**Jak2**) che fosforila HER2. Diviene interessante in quest'ottica l'esame effettuato su circa 70 casi di cancro mammario nella donna che dimostra una alta percentuale di coespressione di PRL e del suo recettore; di questo, il sottogruppo HER2 positivo ha la più alta attività proliferativa, suggerendo un sinergismo tra PRLR e HER2 durante lo sviluppo carcinogenetico.[183]

Il secondo meccanismo di transattivazione di ErbB, che corrisponde all'abilità di differenti recettori di stimolarne indirettamente l'attività chinasi, è stata intensamente studiata nel campo degli antagonisti per i recettori accoppiati alla proteina G (*G protein-coupled receptor*, **GPCR**). Questa collaborazione si è dimostrata necessaria alla trasmissione del segnale mitogenico mediato dalla proteina G alla via Ras-chinasi MAP.[54]

I ligandi della famiglia ErbB sono molteplici (vedi tabella 3.1), ma condividono una catena altamente conservata di 50-55 amminoacidi con 6 residui di cistina che creano 3 ponti disolfuro.[2] Sono prodotti come precursori transmembrana e i domini extracellulari sottoposti ad un processo proteolitico, liberano i fattori di crescita solubili. Degna di nota è la mancanza di un ligando specifico per HER2 che viene quindi considerato più un corecettore. Infatti è il partner preferito per la dimerizzazione con gli altri componenti la famiglia e sembra potenziare il segnale[52]:

- aumentando l'affinità per il ligando;
- diminuendo il tasso di dissociazione;
- aumentando l'efficienza di attivazione delle vie metaboliche;
- diminuendo il tasso di soppressione dei recettori.

HER2 pare coordinare l'intero network di segnali mediati da ErbB in modo tale da permettere l'attivazione di molte vie metaboliche in modo diverso e proprio la mancanza di un ligando specifico permette una più facile regolazione del sistema.

Parte della regolazione viene mediata dalla degradazione del complesso

Tabella 3.1: Classificazione dei ligando della famiglia ErbB. Da Casalini,[16] *modificata*.

Gruppo di ligando	Ligando
Gruppo 1 Lega HER1	Epidermal Growth Factor (EGF) Amphiregulin (AR) Trasforming Growth Factor α (TGF- α)
Gruppo 2 Lega HER1 e HER4	Betacelullin (BTC) Heparin-Binding EGF (HB-EGF) Epiregulin (EPR)
Gruppo 3 Lega HER4	Neuregulins/Neu Differentiation Factors/Heregulins(NRG/NDFs/HRG) Lega HER3 e HER4 Lega HER4 NRG-1 NRG3 NRG-2 NRG4

ligando-recettore. Generalmente il complesso viene sottoposto a endocitosi e, negli endosomi precoci risultanti, i ligando si separano dal recettore e quest'ultimo può essere riciclato sulla superficie cellulare oppure degradato ad opera dei lisosomi. La funzione di cernita operata a livello di endosoma precoce è estremamente importante perché determina quali e in che quantità i recettori verranno degradati o, tornando sulla membrana cellulare, continuano la loro funzione. La ricerca in questo campo ha portato alla scoperta di una proteina, **c-Cbl**, che controlla la via del riciclo/degradazione. Questa molecola legandosi ad un'altra ne determina la distruzione in sede lisosomiale, e mentre HER1 si lega ad essa, HER2 ha solo una debole interazione e HER3 ed HER4 nessuna interazione.[185]

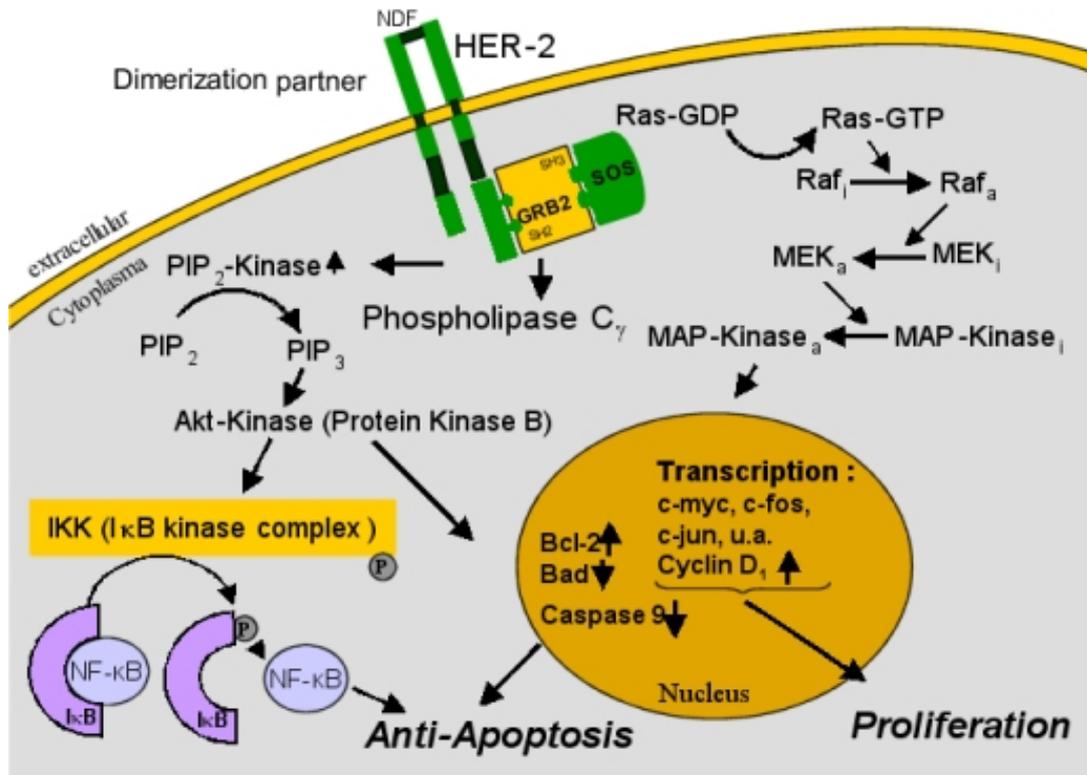
L'azione dei ligandi di ErbB è, nella maggioranza dei casi, di tipo paracrino con l'unica eccezione di EGF.

Il legame con il ligando favorisce la dimerizzazione dei recettori e attiva il dominio tirosin-chinasico; l'autofosforilazione dei residui di tirosina nel segmento C-terminale attiva siti per proteine simili a Src-2 (*Src, homology 2, SH2*) e per proteine con domini leganti fosfotirosina (*phosphotyrosine binding domain, PTB*). Queste famiglie di proteine includono: **Shc, Crk, Grb2, Grb7, Gab1**, le chinasi **Src, Chk, MAPK, fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K)**, le tirosin-fosfatasi **SHP1 e SHP2**.

Ogni recettore ErbB mostra un pattern distinto di autofosforilazione del terminale carbonile che influenza i tipi di molecole segnale arruolate all'attivazione ed è influenzato dai componenti il dimero (vedi figura 3.1). Lo studio della conformazione di HER2 ha portato alla conclusione che il suo normale stato sia simile a quello degli altri recettori nella stato attivato e quindi in una condizione che favorisce la dimerizzazione, ma devono esserci in azione dei meccanismi fisiologici che prevengono l'omodimerizzazione di HER2.[88]

Inoltre i ligando sono molecole bivalenti in cui l'estremità N-terminale caratterizzata da alta affinità e stretta specificità lega un recettore ErbB, mentre l'estremità C-terminale con bassa affinità ma ampia specificità, si legherebbe

Figura 3.1: Schema ridotto delle vie metaboliche attivate da HER2. Da internet, **Universitat Leipzig Department of Molecular and Forensic Toxicology**, <http://www.uni-leipzig.de/ag-hengstler/topic3.htm>; 05/01/07.



preferenzialmente a HER2, spiegando il motivo per cui sia il partner preferito nella formazione dei dimeri.[163]

In oncologia umana il cancro al seno caratterizzato da sovraespressione di HER2, è correlato alla resistenza alla terapia ormonale, tempo inferiore di recrudescenza e minore rapporto di sopravvivenza, quindi ad una prognosi più negativa e viene usato come marker prognostico.[70] Inoltre è stata dimostrata la correlazione tra la sua espressione con il grading istologico e le alterazioni nucleari.[184] Pare che nel cane si riscontrino correlazioni simili, utili dal punto di vista diagnostico e prognostico.[35]

La sovraespressione di HER2 osservata in alcuni tumori è generalmente associata all'amplificazione del suo gene e fa pensare alla possibile formazione di omodimeri attivi ligando-indipendenti responsabili della forte stimolazione alla proliferazione cellulare, oppure alla collaborazione con gli altri ErbB nel potenziarne e prolungarne gli effetti. A dimostrazione di questa seconda ipotesi c'è l'osservazione che molti tumori che esprimono HER2, hanno anche dimostrato una stimolazione autocrina di HER1 tramite il rilascio di peptidi-ligando e il blocco di HER2 inibisce la loro proliferazione.[73]

La sovraespressione di HER2 è necessaria al mantenimento della proliferazione delle cellule tumorali come dimostrato dal blocco dell'attività recettoriale

tramite mAb o inibitori dell'attività chinasi.

Per capire il meccanismo d'azione di HER2 sono stati usati diversi mezzi atti a bloccare le sue attività come l'uso di antibiotici antagonisti, piccole molecole chinasi-inibitori, composti che causano la degradazione di HER2 e l'inattivazione funzionale dovuta a anticorpi mono-catena (single chain antibody, scFv) che provocano la ritenzione nel reticolo endoplasmatico.[69] Un esame degli effettori nucleari più influenzati dalla perdita del segnale di HER2 ha rivelato che i bersagli più importanti sono i regolatori di G_1 , **Myc**, **ciclina D**, **complesso ciclinaE/cdk2** e l'inibitore della chinasi ciclina-dipendente (*cyclin-dependent kinase inhibitor*, **CKI**) **p27Kip1**.

L'espressione della ciclina D è influenzata da HER2 attraverso la via Myc, infatti mentre il blocco del recettore diminuisce l'espressione della ciclina e l'attivazione promuove l'entrata nel ciclo cellulare e l'espressione di ciclina D, l'espressione ectopica di Myc scavalca parzialmente il blocco del ciclo cellulare.[69]

Un altro dei principali bersagli di HER2 è p27Kip1, che viene influenzato a due livelli. Il blocco dell'attività di HER2 porta alla depressione del segnale PI-3K/PKB; come conseguenza, P27Kip, che è prevalentemente citoplasmatico quando fosforilato da PKB su uno specifico residuo di treonina, si rilocalizza nel nucleo.[83] Inoltre, la concomitante perdita delle cicline tipo D permette la redistribuzione di P27Kip1 al complesso ciclina E/cdk2, il cui risultato è una inattivazione del complesso e un blocco di G_1 . [180] E' probabile che entrambi i meccanismi contribuiscano al risultante effetto antiproliferativo dell'inattivazione di HER2.

Sorprendentemente, mentre HER2 lavora molto bene con la via MAPK attraverso molti siti di legame per Shc e Grb2, non sembra in grado di reclutare la subunità regolativa **p85** di PI-3K.[115] Quindi, per attivare questa via, deve dimerizzarsi con un altro ErbB contenente siti per p85 o attivare la via indirettamente, ad esempio tramite un segnale **Ras**. HER3 contiene sei siti di legame per p85 e coinvolge efficientemente questa via e l'inattivazione di HER2 porta alla perdita della fosforilazione di HER3. Queste osservazioni suggeriscono che il ruolo di HER3 nelle cellule cancerose potrebbe essere quello di partner di HER2 sovraespresso promuovendo l'attivazione della via PI-3K/PKB. Infatti il blocco della trascrizione di HER3 in cellule ingegnerizzate ma con HER2 pienamente funzionante porta ad una riduzione del segnale di PI-3K/PKB e di ciclina tipo D, e quindi un arresto nella fase G_1 del ciclo cellulare; quindi l'eterodimero HER2/HER3 funziona come unità oncogenetica nelle cellule tumorali. La dimostrazione di un meccanismo simile in vivo può venire dal riscontro in tumori mammari che sovraesprimono HER2, di una elevata presenza di HER3 e del suo alto grado di fosforilazione.[150]

Lo sviluppo tumorale è un processo graduale che inizia con una iperplasia locale benigna e passo dopo passo arriva al tumore invasivo e capace di metastatizzare. Durante questo processo le cellule tumorali devono acquisire nuove proprietà che sono necessarie allo sviluppo del fenotipo maligno (vedi sezione 2.3). I recettori ErbB e i loro ligandi sono coinvolti in ognuno di questi processi.

Le cellule tumorali non devono solo proliferare ma anche prevenire la normale tendenza delle cellule che esprimono oncogeni di andare in contro ad apoptosi. Sfuggire alla morte cellulare è un tratto essenziale acquisito durante il processo di trasformazione maligna.[58]

La morte cellulare è regolata da due diversi meccanismi ed entrambi possono essere influenzati dal segnale di HER2. La via estrinseca è attivata da segnali esterni ed è mediata da recettori come **Fas** o **TNFR** e la via del clivaggio della **caspaasi 8**. La via intrinseca è attivata da vari tipi di stress cellulari. I livelli relativi, come anche la localizzazione dei membri pro- e antiapoptotici della famiglia di proteine **Bcl** ha il ruolo più importante nel controllo dell'apoptosi intrinseca, caratterizzata dal rilascio di **citocromo-c** e l'attivazione della **caspaasi 9**. [115]

La già ricordata via PI-3K/PKB è particolarmente importante nella mediazione della sopravvivenza cellulare poiché numerosi substrati di PKB controllano direttamente i processi apoptotici. Il membro **Bad** della famiglia proapoptotica **Bcl**, quando fosforilato da PKB, rimane nel citosol dove non è in grado di inibire proteine di sopravvivenza come **Bcl-X_L** nei mitocondri. Un altro bersaglio di PKB è la caspaasi 9, la cui attivazione è bloccata dalla fosforilazione.

Inoltre PKB fosforila bersagli che influenzano indirettamente la sopravvivenza cellulare. I membri della famiglia "forkhead" sono fattori di trascrizione, quando fosforilati da PKB, sono tenuti nel citoplasma e incapaci di stimolare l'espressione di molti geni importanti per l'apoptosi, come **FasL**, **BIM** ed altro. Inoltre, influenza il già ricordato fattore di sopravvivenza **Bcl-X_L** attraverso il fattore di trascrizione **NF- κ B** e altri inibitori dell'apoptosi o **IAP** (*Inhibitors of apoptosis*). A riguardo è da ricordare come linee cellulari che sovraesprimono HER2 sono resistenti all'apoptosi indotta da **TNF** attraverso la via PKB/NF- κ B. [115]

Un'altra importante proteina segnale influenzata da HER2 è la proteina **Stat** che pare influenzare la presenza di proteina **Bcl-X_L**. [51]

Usando un modello sperimentale si è dimostrato come l'attivazione di HER2 porta alla induzione della proliferazione, distruzione della polarità cellulare e riempimento dello spazio luminale. Queste sono tutte caratteristiche che ricordano da vicino uno stato premaligno della lesione e per essere precisi un carcinoma in situ (**DCIS**) in cui le cellule tumorali riempiono, appunto, lo spazio luminale. [108] L'apoptosi è un processo fondamentale nella formazione del lume e viene solo ritardata ma non prevenuta dalla famiglia antiapoptotica **Bcl**. Inoltre, la sovraespressione di oncogeni come la ciclina D1 promuovono la proliferazione cellulare ma il lume si mantiene a causa della morte indotta dall'oncogene, che compensa la divisione cellulare. Solo la simultanea espressione di ciclina D1 e **Bcl-X_L** o, guarda caso, HER2 causa il riempimento del lume, un evento che si può riflettere sulla precoce patogenesi tumorale. [25]

Il processo di angiogenesi è intimamente coinvolto con il cancro. La neovascolarizzazione inizia precocemente ed è essenziale per la crescita e la metastasi. Durante il corso dell'angiogenesi indotta dal tumore, le cellule endoteliali proliferano e vanno incontro a differenziazione; il network recettori/ligandi ErbB influenzano questo processo. Da una parte le cellule endoteliali esprimono

ErbB, dall'altra le RTK sono implicate nello stimolo alle cellule tumorali per la produzione di fattori pro-angiogenici, il più potente dei quali è *Vascular Endothelial Growth Factor* (**VEGF**).

Uno dei fattori di sintesi più importanti di VEGF è l'ipossia, cui sono sottoposte le cellule quando sono troppo lontane dai vasi sanguigni. Questa condizione stimola la cellula alla produzione di *hypoxia-inducible transcription factor 1* (**HIF-1**) una proteina dalla corta emivita il cui livello è regolato dalla concentrazione di ossigeno attraverso un complesso ubiquitina-proteosoma. HIF-1 gioca un ruolo cruciale nel controllo dell'espressione di VEGF e molti altri geni che sono stimolati dalla condizione di ipossia. Comunque, molte cellule tumorali mostrano elevati livelli di VEGF in condizioni di normale ossigenazione, questo suggerisce che il normale controllo dell'espressione di questo gene sia alterato.[69] Linee cellulari di tumori al seno e al polmone con attivazione di HER2 costitutiva, dimostrano alti livelli di mRNA di VEGF e l'aggiunta di erregulina (**HRG**) ne aumenta la trascrizione in relazione al sistema MAPK. Interessante è la recente scoperta di un meccanismo di influenza di mRNA di HIF-1 da parte del dimero HER2/HER3, attraverso la via PI-3K.[80]

HER2 appare avere un ruolo speciale anche nelle fasi di migrazione ed invasione, come ha dimostrato la sua disattivazione funzionale che blocca la migrazione tumorale indotta da EGF, BTC e HRG. Poiché gli eterodimeri con HER2 promuovono una grande attivazione delle vie MAPK e PI-3K, che si fanno avere grande importanza nella migrazione, le cellule che mancano di HER2 possono fallire la migrazione semplicemente perché queste vie sono debolmente stimolate.[154] Le cellule cancerose devono anche acquisire l'abilità di invadere la membrana basale per avere il pieno potenziale metastatico, un processo che richiede attività proteolitica. In questo senso, il trattamento delle linee cellulari con HRG ha dimostrato di incrementare l'espressione di metalloproteinasi della matrice (*matrix metalloproteinase*, **MMP-9**), come di serina-proteasi **uPA** e del suo recettore, aumentando l'invasione. Degno di nota risulta come MMP-9 sia stato recentemente identificato come uno dei geni sovraespressi nei tumori al seno linfonodo negativi con "scarsa prognosi".[168]

Sono state utilizzate molte tecniche per la valutazione dello stato di HER2 nel cancro al seno umano, sia per quanto riguarda il suo gene che per il prodotto proteico. I risultati non sono stati uniformi soprattutto tra la determinazione tramite IHC su tessuto incluso in paraffina e l'amplificazione del gene. Infatti, nei molti studi sul tumore al seno, solo la determinazione della sovraespressione tramite valutazione degli acidi nucleici è stata relazionata ad una prognosi peggiore, mentre i risultati tramite IHC sono discordanti e non viene riconosciuto come valido determinante nelle analisi statistiche multivariabile. Questo fatto può dipendere dalla sensibilità della metodica IHC ad alcuni fattori che non sono sempre tenuti in considerazione. Il tempo e il metodo di fissazione, la processazione e la temperatura della paraffina al momento della inclusione possono determinare la perdita dell'antigene di HER2. Inoltre anche l'Ab primario utilizzato influenza la colorazione a seconda dell'epitopo cui va a legarsi.[124] Ultimamente si è posta particolare attenzione a questo aspetto con l'introduzione sul mercato di un Ab in grado di legarsi solo alla forma

fosforilata del recettore, cioè quella attiva.

In oncologia umana la sovraespressione di HER2 è stata correlata alla resistenza alla terapia ormonale da sola, soprattutto al tamoxifen. Al contrario sembra che neoplasie di questo tipo siano altamente sensibili al trattamento con adriamycin. Infine viene utilizzato in associazione ad altri fattori prognostici, nella predizione della prognosi di pazienti sottoposti a terapia chirurgica e radiante.[124]

A dimostrazione, comunque, dell'importanza di questo gene e del suo prodotto devono essere ricordati i successi della terapia con trastuzumac. Questo è un anticorpo monoclonale umanizzato, il quale lega il dominio extracellulare di **HER2/neu** e dimostra una diretta efficacia antitumorale aumentando il tempo di sopravvivenza nella donne con cancro al seno con sovraespressione di questo gene. Il primo esempio di una lunga serie, si spera, di terapia molecolare specifica nella gestione del tumore al seno.[70]

Il trattamento con Herceptin in tumori che sovraesprimono HER2 diminuisce l'espressione di fattori proangiogenetici incluso VEGF e TGF-*alpha*, risultando in un drammatico cambiamento della vascolarizzazione tumorale e diminuzione della dimensione tumorale.[72] Il meccanismo di funzionamento di Herceptin coinvolge anche l'aumento della quota di HER2 che viene convogliata alla via distruttiva diminuendo la quantità di HER2 sulla membrana cellulare e costringendo gli altri ErbB a dimerizzare in modo diverso e risultando in un segnale mitogeno più debole e meno duraturo.[185]

3.2 Proteina Ki-67

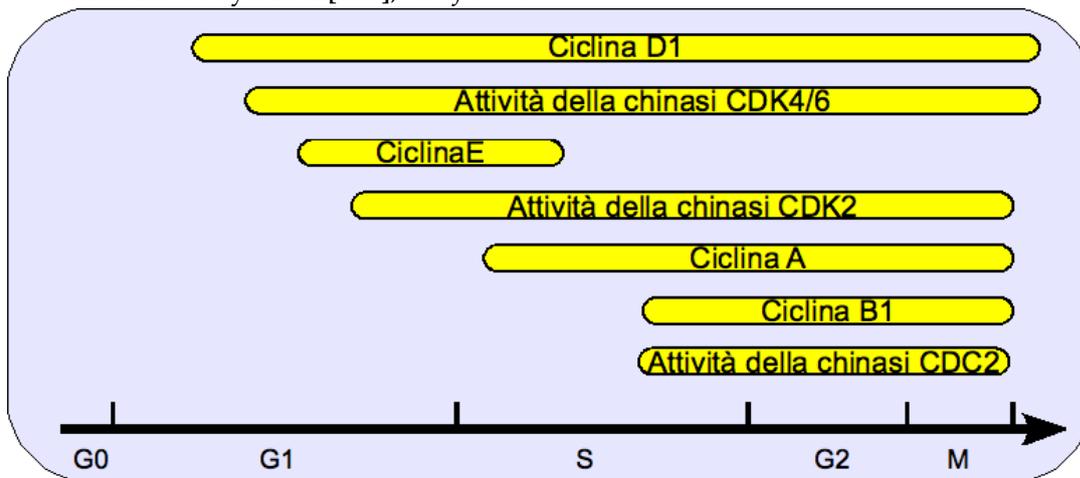
3.2.1 Il ciclo cellulare

Le cellule eucariote in attiva proliferazione attraversano una serie di fasi e punti di controllo, chiamati nel loro insieme ciclo cellulare, che possono essere sinteticamente organizzati come: una fase di crescita presintetica o **G₁** (*Gap 1*); una fase di sintesi del DNA o **S** (*Syntesis*); una fase di crescita premitotica o **G₂** (*Gap 2*), la fase di mitosi o **M**. Le cellule quiescenti, invece, si considerano in una fase denominata **G₀**. [147] Con l'eccezione di quei tessuti composti per la maggioranza da cellule terminali, e quindi in fase **G₀**, nella maggioranza degli altri è contenuta una miscelazione di cellule nelle varie fasi del ciclo.

L'entrata e la progressione nel ciclo cellulare sono controllate dai membri di una famiglia di proteine inducibili chiamate **ciclina**. I livelli e l'attività delle cicline aumentano in determinati stadi del ciclo cellulare, dopo di che sono rapidamente degradate mentre la cellula continua la sua progressione nella fase successiva. Il loro ruolo è quello di regolare proteine costitutive chiamate **chinasi ciclino-dipendenti** (*Cyclin-Dependent Kinase*, **CDK**) legandosi e attivandole. Differenti combinazioni di cicline e CDK sono associati a importanti transizioni del ciclo cellulare e svolgono la loro funzione fosforilando un gruppo selezionato di proteine (vedi figura 3.2). A seconda del bersaglio, la fosforilazione può portare a cambiamenti conformazionali e quindi:

- attivare o disattivare l'attività enzimatica;
- indurre o interferire con le interazioni proteina-proteina;
- indurre o inibire il legame delle proteine con il DNA;
- indurre o prevenire il catabolismo di alcune proteine.

Figura 3.2: Schema ridotto dell'espressione delle cicline e delle CDK durante il ciclo cellulare. Da Obaya 2002[114], *modificata*.



Oltre alla sintesi e degradazione delle cicline, il complesso ciclina-CDK è regolato dal legame con gli **inibitori delle CDK**. Ci sono dei punti di controllo particolarmente importanti ($G_1 \rightarrow S$ e $G_2 \rightarrow S$), nei quali la progressione dipende dalla sufficiente replicazione del DNA e dalla correzione degli eventuali errori. Il fallimento del controllo sulla fedeltà della replicazione porta all'accumulo di mutazioni multiple e potenzialmente dannose. Gli inibitori delle CDK sono proteine la cui sintesi viene stimolata dalla rilevazione di un errore e che bloccano il ciclo cellulare per il tempo sufficiente a permettere la correzione, se questa è possibile. Se invece non lo fosse la cellula andrà in contro ad apoptosi.

La **ciclina D** è la prima ad aumentare nel ciclo cellulare: appare durante la fase G_1 , ma non è più rilevabile nella fase S.[146] Ce ne sono tre isoforme, denominate D1, D2, e D3, ma per semplificare le si considera insieme con il termine di ciclina D. L'attivazione della trascrizione del gene della ciclina D1 dipende dalla via **Ras-Raf-MAPK** (vedi immagine 3.3). Come le altre cicline è instabile e viene degradata attraverso la via ubiquitina-proteosoma. Durante la fase G_1 si lega e attiva CDK4 o CDK6, formando un complesso che fosforila la proteina **RB** (*Retinoblastoma Susceptibility Protein*). La fosforilazione di RB viene considerata un interruttore per il ciclo cellulare. La sua forma poco fosforilata previene la replicazione cellulare legandosi ed inattivando il fattore di trascrizione **E2F**, anche se con questo nome si considera una famiglia di fattori; al contrario la forma fosforilata libera E2F consentendogli la propria attività e quindi eliminando la principale barriera alla progressione nel ciclo cellulare.

I principali geni bersaglio di E2F sono: ciclina E, DNA polimerasi, timidina chinasi, deidrofolato reductasi. Durante la fase M i gruppi fosfato sono rimossi da RB dalle fosfatasi cellulari, tornando nella sua condizione iniziale.

La progressione attraverso la fase S e l'inizio della replicazione del DNA coinvolge la formazione di un complesso attivo **ciclinaE/CDK2**. [34] Come ricordato precedentemente E2F incrementa la trascrizione del gene della ciclina E e delle polimerasi necessarie alla replicazione del DNA. La transizione $G_2 \rightarrow M$ dipende dalla trascrizione, mediata da E2F, della **ciclina A** che formando il complesso ciclina A/CDK2 regola gli eventi della profase mitotica. [162] Il mediatore principale che spinge la cellula oltre la profase mitotica è, però, il complesso **ciclina B/CDK1** che, attivato dalla fosfatasi **Cdc 25**, inizia ad accumularsi nel nucleo nella profase precoce. [113]

L'attività dei complessi ciclina/CDK è finemente regolata dagli inibitori delle CDK (*CDK Inhibitor*, **CKI**) dei quali ci sono due classi principalmente: la famiglia **Cip/Kip** e la famiglia **INK4/ARF**. I componenti di entrambe le famiglie funzionano da oncosoppressori e sono frequentemente alterati nelle neoplasie. [148]

La famiglia Cip/Kip comprende tre componenti **p21**, **p27** e **p57** che si legano e disattivano i complessi ciclina/CDK. L'attivazione trascrizionale di p21 è sotto il controllo di p53.

Il locus umano INK4a/ARF (*Inhibitor of Kinase 4a/Alternative Reading Frame*) codifica per due proteine, **p16INK4a** e **p14ARF**, che bloccano il ciclo cellulare e agiscono da oncosoppressori. p16INK4a compete con la ciclina D per il legame con CDK4 e inibisce l'attività del complesso ciclina D/CDK4 di fosforilare RB. p14ARF, invece, agisce su p53, prevenendo la sua degradazione e origina da una lettura alternativa del gene INK4a, provvedendo ad una via economica di utilizzo della sequenza di codifica.

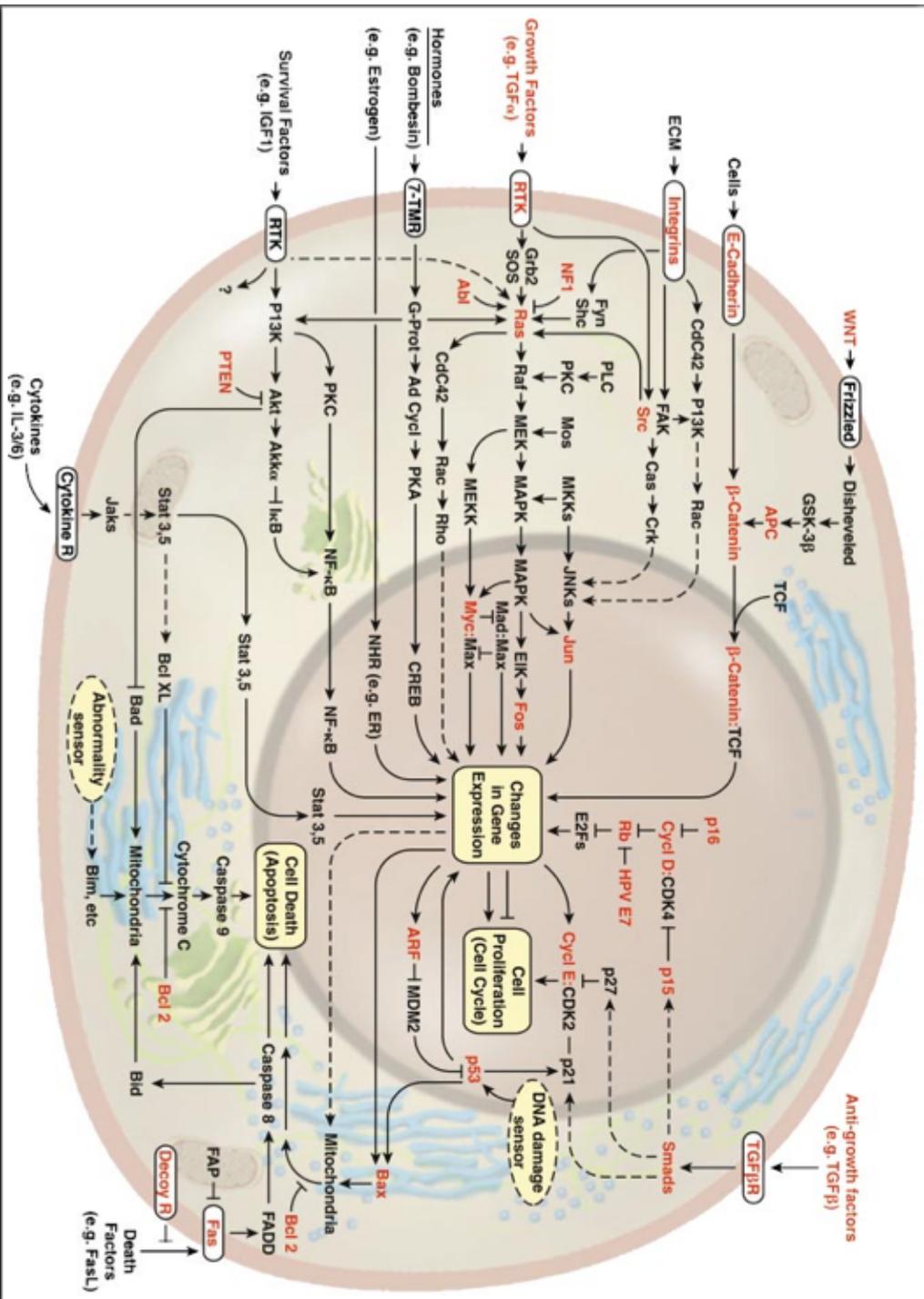
Per funzionare correttamente i punti di controllo richiedono: sensori del danno al DNA, trasduttori del segnale e molecole effettrici. I primi sono le proteine della famiglia **RAD** e della famiglia **ATM** (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), i trasduttori sono i membri della famiglia delle CDK chinasi. Gli effettrici sono diversi a seconda del punto di controllo considerato: p53 per $G_1 \rightarrow S$ e p53 ed altri per $G_2 \rightarrow S$.

3.2.2 La proteina

La proteina **Ki-67** deve il suo nome al prototipo di anticorpo monoclonale generato dalla immunizzazione di topi con i nuclei della linea cellulare L428 di linfoma di Hodgkin umano. Tale laboratorio si trova nella città di Kiel e il clone originale era il numero 67. [45] Il nome è stato conservato anche dopo la decodifica della sua struttura primaria a partire da cDNA, poiché non è stata rilevata nessuna omologia con i peptidi conosciuti e la sua funzione è rimasta sconosciuta.

La caratterizzazione di questo antigene ha comunque rilevato interessanti particolarità. Si trova esclusivamente nelle cellule in attiva proliferazione e una dettagliata analisi del ciclo cellulare rivela la sua presenza nei nuclei delle

Figura 3.3: Schema ridotto delle vie metaboliche coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare. I geni evidenziati in rosso sono quelli di cui si conoscono alterazioni nelle neoplasie. Da Hanahan 2002[58], *modificata*.



cellule nelle fasi G_1 , S, G_2 ed M. Le cellule quiescenti o terminali, quindi in G_0 , non lo esprimono.[44] La sua presenza è stata dimostrata in tutti i tipi di cellule in attiva proliferazione comprese quelle tumorali. Per questo motivo è diventato un eccellente marker per determinare la frazione di crescita di una data popolazione cellulare. Mentre la sua espressione nelle fasi S, G_2 e M è comunemente accettata, durante la fase G_1 è controversa. Una possibile spiegazione può essere nell'ipotesi che esistano tre diverse vie di Ki-67 durante la fase G_1 . [75]

La via di diminuzione di Ki-67 è caratterizzata da un declino dell'espressione di Ki-67 e determina l'uscita dal ciclo cellulare (G_0); se le cellule impegnate in questa via sono stimolate da fattori di crescita, possono rientrare nel ciclo cellulare attraverso la via di aumento di Ki-67 che le porta nella fase S. Le cellule invece che seguono la via stabile di Ki-67 dimostrano un'intensità costante nell'espressione della proteina durante la fase G_1 e corrisponde quindi ad una condizione di crescita ottimale.

La quantità di Ki-67 aumenta nel progredire dalla fase S alla metafase della divisione mitotica per poi ridursi durante l'anafase e la telofase. Questo andamento non può essere spiegato con il semplice accumulo della proteina sintetizzata poiché la sua emivita è stata determinata nell'ordine di circa 60-90 minuti. Deve, quindi, essere il risultato di una sintesi *de novo* regolata insieme ad una via degradativa; una ulteriore prova dell'importante funzione biologica che potrebbe avere Ki-67. Inoltre viene fortemente suggerito che questa proteina sia essenziale nella proliferazione cellulare.

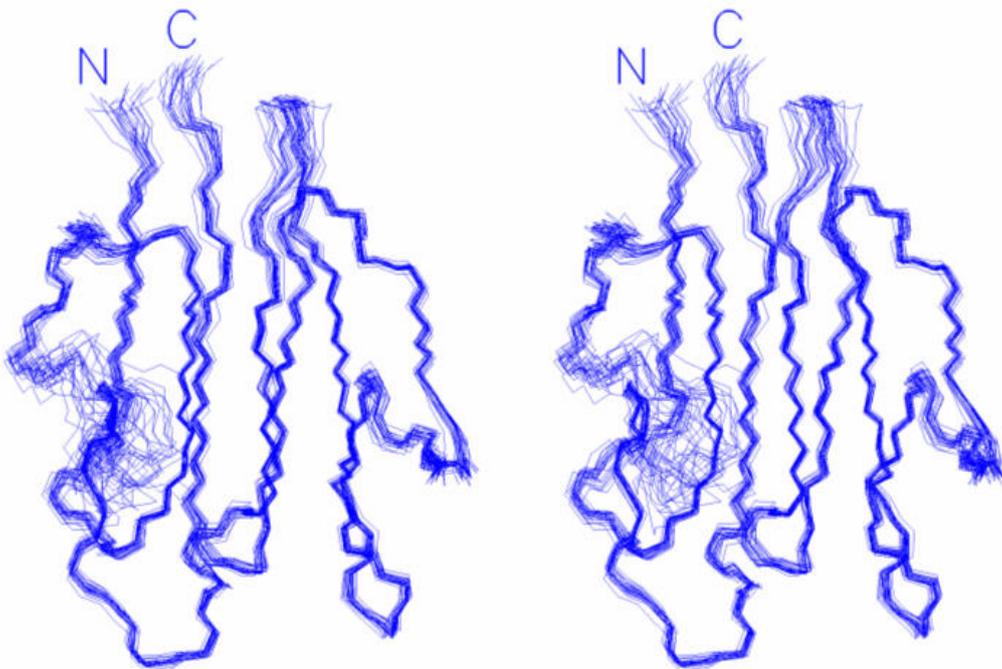
Durante l'interfase Ki-67 è localizzato prevalentemente a livello del nucleolo, nella fase S rimane nella stessa localizzazione; nella profase, in conseguenza alla modificazione post-translazionale si disperde dai nucleoli alla periferia dei cromosomi condensati; nella metafase copre i cromosomi e rimane associata con la cromatina addensata fino all'anafase. La ridistribuzione delle proteine alla periferia dei cromosomi è comune a diverse nucleoproteine e si pensa sia un modo di conservare le proteine che sono necessarie immediatamente nella fase G_1 precoce, sembra infatti che Ki-67 sia necessaria in questa fase per riassembleare il nucleo e riorganizzare il nucleolo. Durante la mitosi è l'unico momento in cui l'espressione di Ki-67 è citoplasmatica.[38]

A parte la sua applicazione pratica sono stati fatti pochi passi nella definizione della sua funzione primaria. Grazie alla clonazione e al sequenziamento dell'intero cDNA sono state descritte 2 isoforme, generate da uno splicing alternativo del mRNA immaturo. Entrambe le isoforme, rispettivamente di 320 e 359 KDa, contengono una grande regione centrale con 16 elementi ripetitivi codificata da un singolo esone (il numero 13) di 6845 paia di basi.[140] Le due isoforme si differenziano per l'assenza o la presenza della sequenza codificata dall'esone 7. L'intero locus genico, che si trova sul cromosoma 10q25 umano, è stato sequenziato e comprende circa 30000 paia di basi.[33] La struttura primaria della proteina è caratterizzata da 10 sequenze putative per la localizzazione nucleare, 143 potenziali siti di fosforilazione per protein-chinasi C, 89 per casein-chinasi II, 2 siti tirosin-chinasi e 8 siti consenso per la chinasi CDC2. [140] Il fallimento della ricerca di una proteina omologa dipendeva

anche dagli algoritmi che confrontavano le proteine e che rivelavano solo regioni altamente conservate. Usando invece un metodo più avanzato si è trovato un dominio “forkhead”-associato (FHA) nella regione N-terminale (vedi immagine 3.4).[68] Nello stesso studio si è dimostrato che questa sequenza è comune in alcune proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare. Purtroppo la funzione del dominio FHA non è chiara sebbene recentemente si sia scoperto possa interagire con **Rad9** nell’integrazione del segnale di danno al DNA.[158]

La regione centrale contenente i 16 elementi ripetuti, ognuno dei quali di

Figura 3.4: Dominio FHA di Ki-67. Da internet, **Ohio State University Department of Chemistry**, http://www.chemistry.ohio-state.edu/~tsai/fha_domain.htm; 24/01/07.



122 amminoacidi e nel quale si trova l’epitopo riconosciuto dall’anticorpo, sembrava essere una caratteristica unica della proteina. Questa convinzione è venuta meno con la scoperta di una proteina nelle cellule del *Potoroo dal naso lungo*¹ (*Potorous tridactylus*), detta **chmadrin**. Sebbene questo dominio sia più piccolo e si siano trovate altre similitudini tra le due proteine (come il dominio FSH), non è possibile dire se chmadrin sia l’equivalente di Ki-67 per l’animale in questione oppure sia il componente di una nuova famiglia di proteine correlate a Ki-67.[159]

Nonostante la difficoltà di studio di questa molecola particolarmente sensibile al clivaggio proteico e difficilmente separabile con i normali gel elettroforetici, si sono determinate caratteristiche interessanti:[144]

¹Si tratta di un mammifero marsupiale australiano. Vedi http://en.wikipedia.org/wiki/Long-nosed_Potoroo

- durante la mitosi viene fosforilata ma non si conoscono le chinasi e le fosfatasi coinvolte, ma sono controllate dal complesso ciclina B/CDC2;[39]
- ci sono numerose sequenze putative per la localizzazione nucleare, ma non tutte sono importanti in egual misura;
- pare esistano più delle due isoforme descritte finora e che potrebbero essere associate allo stadio fisiologico della cellula o al punto del ciclo cellulare.

Nel 1983, quando il primo Ab contro Ki-67 è stato descritto, era stato appena proposto uno schema di controllo del ciclo cellulare delle cellule eucariote e nello stesso anno è stato introdotto il concetto di ciclina. Negli anni seguenti gli studi si concentrarono sempre di più sulla spiegazione del complicato network che controlla il ciclo cellulare, ma nonostante la mole di dati, nessuno degli elementi di controllo è stato funzionalmente collegato alla proteina Ki-67.

Il prototipo di Ab Ki-67 ha una limitata reattività nei confronti delle altre specie con l'unica eccezione dei primati; è stato quindi sviluppato un nuovo pannello di anticorpi monoclonali designati come **MIB** (*Molecular Immunology Borstel*). Tra questi **MIB-1** viene usato per determinare l'equivalente di Ki-67 in molti mammiferi come bovino, cane, cavalle e pecora.[144]

Per essere considerato un accettabile marker di proliferazione cellulare si devono rispettare due requisiti fondamentali:

- l'antigene dovrebbe essere sempre presente durante il ciclo cellulare di tutte le cellule di tutti i tipi;
- l'uscita dal ciclo cellulare dovrebbe essere seguita dalla rapida scomparsa dell'antigene.

La proteina Ki-67 rispetta la prima caratteristica come dimostrato da molti studi; per quanto riguarda la seconda, sebbene si consideri rispettata, è più difficile da soddisfare in quanto non è ancora chiaramente definito cosa si intenda per cellula in uno stadio di non proliferazione e non si sappia ancora quale sia il punto del ciclo cellulare che debba essere considerato di "non ritorno".[144]

La correlazione tra l'espressione di Ki-67 e altri marcatori di proliferazione come la **frazione in fase S** misurata tramite citometria a flusso, l'attività della **tirosin-chinasi**, l'**indice mitotico** e l'**uptake in vivo di bromodeossiridina** (quest'ultimo considerato la metodica *gold standard*) è stata oggetto di numerosi studi i quali hanno dimostrato l'alto grado di affidabilità di questo test. Se si considera inoltre l'economicità, la facilità di esecuzione e di lettura, risulta chiaro capire l'ampio grado di diffusione avuto dalla ricerca di questo marker.[164, 85] Recentemente è stato descritto un nuovo marker di proliferazione, la proteina di mantenimento minicromosomica (*Minichromosome Maintenance Protein 2*, **MCM2**) che sembra essere più sensibile dei precedenti e dimostra una alta correlazione con la determinazione IHC di Ki-67.[49]

Come ci si può aspettare esiste un collegamento tra l'espressione di Ki-67 e il rapporto di apoptosi in quanto rappresenta la principale controparte alla

crescita tumorale.[84] La correlazione tra espressione di ER e Ki-67 è inversa e suggerisce come durante il processo carcinogenetico, nel progredire verso un fenotipo maligno, ci sia una graduale perdita della crescita mediata dagli ormoni steroidei a favore di una crescita autonoma. In questo senso e viste le sue particolarità, si spiega la correlazione non ben definita con HER2.[164] Infine anche il grado istologico è correlato con Ki-67 anche perché l'evidenza di mitosi interviene nel determinare il punteggio (vedi tabella 2.4).

In medicina umana è stato ampiamente dimostrato che l'espressione di Ki-67 è un fattore prognostico indipendente in analisi multivariabile per la sopravvivenza e la recrudescenza della lesione.[144] Viene usato per discriminare sottogruppi prognostici nel cancro al seno precoce con linfonodo negativo.[164] Viene inoltre usato come fattore di predizione precoce dell'efficacia del trattamento.

Capitolo 4

OBIETTIVI DELL'INDAGINE

Gli obiettivi del presente lavoro sono:

- Messa a punto di un protocollo di immunohistochimica per la valutazione dello stato di espressione del recettore HER2 nel tumore mammario di cane, su campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina.
- Messa a punto di un protocollo di immunohistochimica per la valutazione dello stato di espressione del marker di proliferazione Ki-67 nel tumore mammario di cane, su campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina.
- Determinare eventuali correlazioni tra lo stato di espressione di HER2 e le caratteristiche morfologiche, l'espressione di Ki-67 e altre informazioni di significato prognostico.
- Confronto tra metodica manuale e tramite macchinario del protocollo di immunohistochimica.

Capitolo 5

MATERIALI E METODI

5.1 Campioni

I campioni utilizzati provengono dal database del Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria della facoltà di Medicina Veterinaria di Padova e derivano dalla routinaria attività diagnostica offerta dai laboratori della facoltà. Sono stati fissati in formalina tamponata al 10% (formaldeide al 4%), processari entro 48 ore dalla registrazione e inclusi in paraffina. Associati a ciascuno di questi ci sono dati riguardanti l'anamnesi e l'esame clinico operato dalle strutture private che hanno mandato il campione.

Viene preparata una sezione a 4 μm e colorata con ematossilina/eosina (H&E) secondo procedura standard. L'analisi morfopatologica si effettua tramite microscopio ottico e le lesioni neoplastiche riscontrate vengono classificate in base alle linee guida della WHO (*World Health Organization*) (vedi 2.5). Il referto viene, quindi, reso disponibile sul database online di SimbaVet.

Tramite maschera di ricerca sono stati selezionati i casi relativi a neoplasia mammaria nel cane per un periodo di tempo a cavallo tra la fine del 2005 e l'inizio del 2006.

Si sono realizzate sezioni da 4 μm dei campioni scelti per essere sottoposti a IHC su vetrini speciali:

- alcune sezioni su vetrini adiuvati con silano;
- altre su vetrini a carica elettrostatica Superfrost® Plus.

5.1.1 Protocollo di preparazione dei vetrini adiuvati con silano

Per la preparazione dei vetrini in silano ((3-aminopropyl)triethoxy-silane) Sigma-Aldrich® si procede come segue:

- lavaggio dei vetrini in acetone per 5 minuti;
- passaggio in soluzione di silano al 2% in acetone per 5 minuti;
- due lavaggi successivi da 2 minuti ciascuno in H₂O distillata;

- lasciare asciugare prima dell'uso sotto cappa o in stufa;
- conservare in scatola per evitare il deposito di polvere.

5.2 Procedura immunoistochimica

5.2.1 Procedura immunoistochimica manuale

La procedura immunoistochimica (IHC) manuale prevede una serie di operazioni che sono comuni, almeno in termini generali, per qualsiasi proteina si vada ad indagare.

1. **Deparaffinazione e blocco delle perossidasi endogene**

Dal campione incluso deve essere tolta la paraffina ed essere reidratato per permettere le successive operazioni di colorazione. Si usano due soluzioni di xilene 100% e soluzioni scalari di alcol 100%, 90%, 70%, 50%, infine acqua distillata. Ogni passaggio prevede un tempo di 5 minuti.

Il blocco delle perossidasi endogene serve invece ad evitare che il cromogeno successivamente usato vada a reagire con altre perossidasi invece che con quelle legate all'anticorpo secondario. Si può fare in due momenti: durante la deparaffinazione o dopo di essa. Nel primo caso il perossido di idrogeno allo 0,3% deve essere in soluzione alcolica (metanolo assoluto), nel secondo deve essere in acqua distillata al 3%. Nel caso il metodo di sviluppo sfrutti un altro mezzo di visualizzazione questo passaggio può non essere necessario.

2. **Smascheramento o Antigen Retrieval (AG)**

Durante questa fase si cerca di rendere disponibili di nuovo gli epitopi delle proteine che potrebbero risultare nascosti dal processo di fissazione con formalina, la quale crea dei legami tra le molecole proteiche. A tal fine possono essere usate diverse metodiche che vanno dall'autoclave al forno a microonde, in condizioni di pH particolari ed eventualmente adiuvati da enzimi proteolitici. Il classico esempio è l'utilizzo del tampone citrato (TC) a pH 6 (vedi tabella 5.1).

Alla fine di questa operazione si effettuano 2/3 lavaggi in PBS (vedi tabella 5.2) da 5 minuti l'uno.

3. **Blocking o eliminazione delle interazioni aspecifiche**

La rinnovata disponibilità di porzioni proteiche appena raggiunta permette alle stesse di avere interazioni aspecifiche nei confronti di altre proteine e quindi anche dell'anticorpo primario che noi andremo ad utilizzare. Per impedire questi legami, che non hanno a che vedere con l'interazione antigene-anticorpo, viene aggiunta una proteina che vada a legarsi in questi siti di interazione aspecifica. Può essere usato il BSA (Bovine Serum Albumin) al 5% o il siero di capra al 10% in PBS per 30 minuti. Questa fase come le successive si eseguono in camera umida per limitare l'evaporazione.

Tabella 5.1: Preparazione del tampone citrato 0,01 M a pH 6 per lo smascheramento termico.

Soluzione A	acido citrico (PM 210,14/anidro 192,43)
	21,02 g da portare a 1 l di H ₂ O distillata
Soluzione B	sodio citrato granulare (PM 294,1)
	29,41 g da portare a 1 l di H ₂ O distillata
Soluzione madre	4,5 ml di soluzione A
10x	20,5 ml di soluzione B
	portare a 250 ml in H ₂ O distillata

Tabella 5.2: Preparazione di PBS 0,2 M a pH 7 per i lavaggi. **Legenda:** WS: Work Solution; SS: Storage Solution

W. S.	NaH ₂ PO ₄	sol. 0,2 M	30 ml	→	NaH ₂ PO ₄	1,987 g
	Na ₂ HPO ₄	sol. 0,2 M	70 ml	→	Na ₂ HPO ₄	4,776 g
	NaCl		17 g	→	NaCl	17 g
						portare a 2 litri
S. S.	1 litro	NaH ₂ PO ₄	9,935 g			
		Na ₂ HPO ₄	23,88 g			
		NaCl	85 g			
	2 litri	NaH ₂ PO ₄	19,87 g			
		Na ₂ HPO ₄	47,76 g			
		NaCl	170 g			
	3 litri	NaH ₂ PO ₄	29,81 g			
		Na ₂ HPO ₄	71,64 g			
		NaCl	255 g			

A questo punto se gli anticorpi primari sono diluiti in acqua si effettua un lavaggio in PBS per 5 minuti, se invece sono diluiti in BSA 2,5% allora si può passare immediatamente all'incubazione con l'anticorpo primario.

4. Incubazione con anticorpo primario

L'anticorpo deve essere diluito nelle concentrazioni suggerite dalla casa produttrice oppure dalla letteratura e messo a contatto con le fettine di campione. L'incubazione può avvenire a temperatura ambiente e durare alcune ore oppure a 4°C per tutta la notte (overnight).

Successivamente si ripetono ancora il 2/3 lavaggi in PBS per 5 minuti l'uno.

5. Incubazione con anticorpo secondario

L'anticorpo secondario può essere un anti-mouse o un anti-rabbit a seconda che quello primario si rispettivamente monoclonale o policlonale ed è complessato con una perossidasi (sistema DAKO EnVision™) che

servirà poi per lo sviluppo del segnale. Viene lasciato agire a temperatura ambiente per 30 minuti e poi si eseguono nuovamente 2/3 lavaggi in PBS per 5 minuti l'uno.

6. Sviluppo della reazione

La reazione viene visualizzata dalla reazione della perossidasi complessata all'anticorpo secondario con una soluzione di cromogeno-substrato preparata al momento e lasciata agire per 8 minuti. Il sistema usato viene chiamato **Peroxidase Substrate Kit** o più comunemente **DAB kit**(diaminobenzidina-perossido di idrogeno) Vector Laboratories. Viene quindi fatto un lavaggio in acqua distillata.

7. Controcolorazione e disidratazione

Viene usata l'ematossilina di Mayer per 1 minuto per la controcolorazione e successivamente viene fatto un lavaggio per mezzo di acqua corrente per 5 minuti.

Infine i preparati devono essere disidratati per permettere il montaggio con balsamo del Canada. Si usano soluzioni crescenti di alcol (50%, 70%, 90%, 100%) e infine xilene.

I passaggi particolari dei tre protocolli usati sono raccolti in tabella 5.3.

Tabella 5.3: Riepilogo schematico dei protocolli seguiti per l'esecuzione dell'IHC manuale sulle tre proteine relative all'indagine. **Legenda:** * Nonostante l'anticorpo sia diluito in BSA al 2,5% in PBS si preferisce effettuare comunque un preventivo lavaggio in PBS dopo il blocking.

	Recettore HER2/neu	Ki-67
Blocco delle perossidasi	0,3% H ₂ O ₂ metanolo assoluto	0,3% H ₂ O ₂ metanolo assoluto
AG	121° C autoclave per 2 min in TC pH 6	121° C autoclave per 2 min in TC pH 6
Blocking	BSA al 5% in PBS	BSA al 5% in PBS
Ab primario	Ab policlonare (rabbit) DAKO 1:250 in BSA 2,5% in PBS*	Ab monoclonale (mouse) clone MIB-1 1:50 in BSA 2,5% in PBS
Incubazione	4°C Overnight	4°C Overnight
Ab secondario	Anti-rabbit EnVision DAKO	Anti-mouse EnVision DAKO
Controllo positivo	Carcinoma HER2 3+	Interno, centri germinativi linfoidi

5.2.2 Procedura immunoistochimica automatica

Durante il periodo della sperimentazione il laboratorio di istopatologia si è fornito di uno strumento per la colorazione IHC, Benchmark®Ventana

Medical Systems. La macchina permette la colorazione automatica di 20 sezioni contemporaneamente, eseguendo tutte le operazioni appena descritte in maniera automatica. Inoltre ognuna delle postazioni occupate dal vetrino è indipendente dalle altre e permette di effettuare colorazioni per anticorpi diversi e con protocolli diversi. L'unica operazione manuale è l'aggiunta dell'anticorpo primario in quanto durante le fasi di prova della macchina si dovevano aggiustare le metododiche. La stesura della goccia sul vetrino e la miscelazione sono controllati automaticamente tramite pipettatrici automatiche e getti d'aria. La camera umida viene mantenuta grazie all'azione di una soluzione oleosa che ricopre la goccia sul vetrino impedendo l'evaporazione. La procedura con macchina, inoltre, non richiede la presenza di un controllo negativo. I preparati alla fine della corsa di colorazione devono essere solo lavati, disidratati e quindi montati con vetrino coprioggetto e balsamo del Canada.

I protocolli manuali sono stati aggiustati a seconda delle nuove caratteristiche della macchina attraverso consigli della ditta produttrice e in base a diverse prove effettuate nel periodo della sperimentazione. In tabella 5.4 vengono riportati in maniera schematica i protocolli relativi alle due proteine indagate.

Tabella 5.4: Riepilogo schematico dei protocolli seguiti dalla macchina per l'IHC.

	Recettore HER2/neu	Ki-67
Smascheramento	Cell Conditioning breve 8 min a 95°C	Cell Conditioning breve 8 min a 95°C
	Cell Conditioning medio 30 min a 100°C	Cell Conditioning medio 30 min a 100°C
Incubazione Ab primario	18 min	10 min
Controcolor.	Ematossilina 4 min	Ematossilina 6 min

5.3 Valutazione della colorazione immunostochimica

5.3.1 Procedura immunostochimica manuale vs. automatica

Si è valutata la differenza di colorazione immunostochimica tra la metodica manuale e la metodica automatica, in base a parametri quali:

- l'intensità della reazione IHC;
- la chiarezza del preparato;
- il contrasto con il tessuto negativo e il fondo;

- la presenza di falsi positivi o falsi negativi;
- la velocità di esecuzione;
- la ripetibilità.

5.3.2 Recettore HER2

L'intensità della colorazione dei vetrini indagati per HER2 è stata quantificata attraverso il sistema HercepTest (DAKO). HercepTest è il test diagnostico della DAKO approvato dalla FDA (Food and Drug Administration). Si tratta di un sistema semi-quantitativo per determinare la sovraespressione di HER2 nei tessuti derivanti da cancro al seno umano (vedi tabella 5.5). La misurazione è stata effettuata con microscopio ottico (Microscopio Olympus BX41) con obiettivo 40x su 10 campi microscopici contando 100 cellule per un totale di 1000 cellule. Tutte le microfotografie sono state scattate tramite l'utilizzo di una macchina fotografica digitale Olympus DP12 collegata al microscopio.

Tabella 5.5: Classificazione dell'espressione di HER2 determinata tramite IHC metodo Hercep Test (Dako)

Punteggio	Stato di espressione HER2	Aspetto del vetrino
0	Negativo	Non si osserva nessuna colorazione oppure la membrana si colora in meno del 10% delle cellule tumorali.
1+	Negativo	Una debole colorazione di membrana è riscontrabile in più del 10% delle cellule tumorali. La membrana è solo parzialmente colorata.
2+	Positivo	Una colorazione di membrana completa da debole a moderata si osserva nel 10% delle cellule tumorali.
3+	Positivo	Una colorazione di membrana completa in più del 10% delle cellule tumorali.

5.3.3 Marker di proliferazione Ki-67

Il metodo di quantificazione è stato effettuato con microscopio ottico (Microscopio Olympus BX41) su 10 campi microscopici a 40X contando 100 cellule per un totale di 1000. Il valore è stato poi espresso con metodica semi-quantitativa considerando come positivi i campioni se presentavano più del 10% della

popolazione neoplastica con nucleo positivo e negativi al di sotto di questo valore. Il gruppo dei positivi è stato ulteriormente diviso in: + 10-20%, ++ 20-40% e +++ >40%.

5.4 Raccolta informazioni di follow-up

Durante l'esecuzione delle prove, i colleghi Medici Veterinari sono stati contattati per ottenere informazioni riguardo all'evoluzione della situazione e completare i dati con il follow-up. La raccolta dei dati è stata effettuata tramite la compilazione di un apposito questionario, presente in allegato B, inviato alle strutture tramite mail. In alcune circostanze, l'intervista si è tenuta per via telefonica in quanto è risultata particolarmente gradita quando i casi di interesse erano molto pochi.

5.5 Analisi statistica

Le analisi statistiche relative ai risultati di positività in relazione ai diversi tipi di lesione e alle tipologie istologiche sono state effettuate mediante l'utilizzo di test non parametrici quali test di Wilcoxon e test di correlazione di Spearman. Il limite di significatività è stato fissato con $p \leq 0,05$.

Capitolo 6

RISULTATI

6.1 Indagine immunohistochimica

La popolazione su cui è stata eseguito lo studio è formata da 60 pazienti le cui caratteristiche principali di segnalamento sono riassunte in tabella 6.1. Purtroppo i dati raccolti sono incompleti a causa della compilazione non corretta delle richieste di accertamento e della scarsa collaborazione riscontrata dalle strutture intervistate, di conseguenza tutti i dati medi che verranno di seguito citati si riferiscono al gruppo di casi per i quali quella informazione era disponibile.

L'età media si riferisce a quella all'epoca della diagnosi e ed è 9,8 anni $\pm 2,79$. Il 40,38% della popolazione è di razza, mentre il rimanente è rappresentato da meticci. Le cagne sterilizzate al momento della rimozione della neoplasia sono il 32,76% e il 6,67% conduce una vita all'esterno. Quasi 85% delle lesioni analizzate è insorta nelle 3 paia di mammelle caudali e fila destra e sinistra sono quasi equamente rappresentate (rispettivamente 20 e 22 casi). La dimensione media dei noduli indagati è 1,53 cm.

Si sono indagate 36 lesioni benigne, 48 maligne e 2 linfonodi con interessamento metastatico per un totale di 84 lesioni neoplastiche le cui diagnosi morfologiche sono state raggruppate in tabella 6.2. In particolare 18 casi (30%) presentano più di una lesione sullo stesso soggetto. Si può notare la presenza della lesione denominata "carcinoma in tumore misto benigno"; questo termine è stato usato per mettere in evidenza lesioni particolari nelle quali, nonostante la presenza di tessuto cartilagineo, la componente epiteliale neoplastica presenta caratteristiche spiccate di malignità dal punto di vista morfologico. Inoltre 2 carcinoma papillare semplice e 1 carcinoma tubulare complesso sono stati definiti come "infiltranti" in quanto presentavano in maniera evidente la tendenza a diffondersi nel parenchima circostante. Si è voluta aggiungere questa ulteriore caratterizzazione in quanto con il termine "carcinoma" si intende una neoplasia maligna che potrebbe infiltrare i tessuti circostanti ma non risulta evidente nella sezione esaminata e con il termine "carcinoma in situ" quando le cellule cancerose devono ancora attraversare la membrana basale della struttura preesistente.

Tabella 6.1: Dati di segnalamento disponibili per i casi presi in considerazione durante la prova sperimentale.

Caso	Razza	Intera/Sterilizzata	Età (anni)	Ambiente	Posizione	Dimensioni (cm)
1	Dalmata	I	11	Indoor	IV sx	4x4
2	Pintsher	I	8	Indoor	nd	nd
3	Meticcio	I	9	Indoor	III IV sx	1
4	Rottweiler	S	6	Indoor	II III sx	1,5-2
5	Meticcio	I	9	Indoor	IV dx I sx	0,5
6	West Highland White Terrier	I	6	Indoor	nd	nd
7	Meticcio	S	9	Indoor	linea mammaria sx	1,5
8	Pastore Tedesco	I	nd	Indoor	nd	0,8-1,0
9	Pastore Tedesco	I	nd	Indoor	III dx	0,2-0,3
10	Meticcio	I	13	Indoor	III IV V dx	0,6-1,0
11	Maltese	S	11	Indoor	nd	0,8x0,8
12	Meticcio	S	11	Indoor	nd	nd
13	Meticcio	I	5	Indoor	III dx	3
14	Meticcio	I	9	Indoor	linea mammaria sx	nd
15	Pastore Tedesco	I	7	Outdoor	III IV V	2
16	Bassotto Tedesco	I	9	Indoor	linea mammaria dx	0,2
17	Meticcio	I	11	Indoor	linea mammaria dx	0,5-1,0
18	American Staffordshire Terrier	S	3	Indoor	nd	nd
19	Meticcio	I	10	Indoor	nd	nd
20	Yorkshire Terrier	I	9	Indoor	nd	1,5
21	Meticcio	S	14	Indoor	nd	0,6
22	Pastore Tedesco	S	10	Indoor	I II V sx	0,7-2 10

Tabella 6.1: Dati di segnalamento disponibili per i casi presi in considerazione durante la prova sperimentale.

23	Meticcio	I	8	Indoor	nd	0,6
24	Schnauzer medio	I	8	Indoor	nd	1,5
25	Carlino	S	10	Indoor	nd	3
26	Rottweiler	S	13	Indoor	nd	1 x 0,5
27	Meticcio	I	7	Indoor	nd	1
28	nd	I	nd	Indoor	IV V	1
29	nd	I	12	Indoor	nd	nd
30	American Staffordshire Terrier	S	3	Indoor	III dx	0,5
31	Golden Retriever	I	8	Outdoor	nd	1,5
32	Meticcio	I	9	Indoor	V sx	2
33	nd	I	12	Indoor	nd	nd
34	Meticcio	I	12	Indoor	nd	nd
35	Yorkshire Terrier	S	14	Indoor	nd	1
36	Meticcio	I	13	Indoor	nd	nd
37	Meticcio	I	7	Indoor	V dx	nd
38	Bassotto Tedesco	I	13	Indoor	V dx	0,5
39	Yorkshire Terrier	S	14	Indoor	nd	nd
40	Yorkshire Terrier	I	nd	Indoor	nd	nd
41	Meticcio	I	10	Indoor	IV sx	1
42	Beagle	I	nd	Outdoor	nodulo paramammario e V dx	0,5-1
43	Beaucheron	I	10	Indoor	II III dx	2-3
44	Rottweiler	I	7	Indoor	III sx	1

Tabella 6.1: Dati di segnalamento disponibili per i casi presi in considerazione durante la prova sperimentale.

45	Barbancino	S	12	Indoor	linea mammaria sx	nd
46	nd	I	8	Indoor	IV dx	1
47	nd	I	11	Indoor	II III dx	0,3-0,8
48	Meticcio	I	14	Indoor	nd	0,3-0,5
49	nd	I	10	Outdoor	nd	3
50	Meticcio	I	11	Indoor	IV V	nd
51	Bassotto Tedesco	S	5	Indoor	III sx	nd
52	Rottweiler	I	6	Indoor	IV sx III dx	1 0,1
53	nd	S	14	Indoor	linea mammaria sx	0,3-3
54	Barbancino	S	12	Indoor	linea mammaria sx	nd
55	Meticcio	S	12	Indoor	nd	nd
56	Yorkshire Terrier	I	nd	Indoor	IV sx	nd
57	nd	nd	nd	Indoor	linea mammaria dx	nd
58	Barbancino	I	10	Indoor	nd	0,2x0,3
59	Meticcio	S	11	Indoor	nd	nd
60	nd	S	13	Indoor	linea mammaria sx	nd

Infine si sono riscontrate delle lesioni particolari, un carcinoma tubulare complesso, un carcinoma papillare complesso e un carcinoma solido complesso, dove era evidente come i caratteri di malignità fossero propri anche delle cellule mioepiteliali oltre che quelle epiteliali. Nella classificazione WHO non esiste nessuna denominazione per queste eventualità e come tali sono state raggruppate tra i tumori complessi. Nonostante ciò, vista la particolarità della lesione si è coniato il termine di “carcinoma e mioepitelioma maligno” il quale viene utilizzato nella tabella 6.3 per definire questi casi.

Le diagnosi morfologiche di alcune lesioni sono state revisionate da due patologi in quanto presentavano delle caratteristiche “border line”. Nelle prossime descrizioni verranno segnalate soprattutto a riguardo della risposta avuta ai due marker indagati.

Tabella 6.2: Tabella riassuntiva delle lesioni neoplastiche riscontrate nei casi sottoposti a indagine IHC.

Carcinoma in situ	1		
Carcinoma complesso	21	Carcinoma tubulare complesso	11
		Carcinoma tubulopapillare complesso	4
		Carcinoma solido complesso	2
		Carcinoma papillare complesso	2
		Carcinoma tubulosolido complesso	1
		Carcinoma tubulare complesso infiltrante	1
Carcinoma semplice	17	Carcinoma solido semplice	5
		Carcinoma tubulare semplice	4
		Carcinoma tubulosolido semplice	4
		Carcinoma papillare semplice infiltrante	2
		Carcinoma papillare semplice	1
		Carcinoma tubulopapillare semplice	1
Carcinoma in tumore misto benigno	6		
Carcinosarcoma	1		
Carcinoma mucinoso	1		
Carcinoma adenosquamoso	1		
Adenoma semplice	8	Adenoma tubulare semplice	5
		Adenoma cistopapillare	1
		Adenoma tubulopapillare semplice	1
		Adenoma tubulocistico semplice	1
Adenoma complesso	20	Adenoma tubulare complesso	16

Tabella 6.2: Lesioni neoplastiche

	Adenoma papillare complesso	2
	Adenoma tubulopapillare complesso	1
	Adenoma tubulocistico complesso	1
Tumore misto benigno	6	
Linfonodo con invasione metastatica	2	
Totale lesioni neoplastiche	84	

Le lesioni neoplastiche sono sovente accompagnate da lesioni displastiche/iperplastiche, in particolare adenosi (72,62%) ed ectasia duttale (22,62%). Per la valutazione dello stato generale di espressione dei marcatori indagati si è confrontata la lesione cancerosa e la lesione iperplastica/displastica ove fossero presenti nella stessa sezione.

Per quanto riguarda HER2 delle 36 lesioni benigne: 11 sono negative (30,56%), 17 sono negative 1+ (47,22%) e 8 sono positive 2+ (22,22%). Delle 48 lesioni maligne: 18 sono negative (37,50%), 24 sono negative 1+ (50%) e 6 sono positive 2+ (12,5%). Ne risulta che il numero di casi positivi sia 11 su 60 totali (18,33%) e quindi sia confrontabile con i dati riscontrati in letteratura, ma il dato nuovo è che su 14 lesioni positive per HER2 8 sono neoplasie benigne e 6 neoplasie maligne.

Per Ki-67 delle 36 lesioni benigne: 22 sono negative (61,1%), 12 sono positive + (33,3%) e 2 sono positive ++ (5,6%). Delle 48 lesioni maligne: 14 sono negative (29,17%), 21 sono positive + (43,75%), 9 sono positive ++ (18,75%) e 4 sono positive +++ (8,3%). Alcuni di questi risultati hanno determinato una revisione delle diagnosi morfologiche da parte di due patologi i quali hanno segnalato le lesioni segnalate nella tabella 6.3 con il simbolo †

Tabella 6.3: Tabella riassuntiva delle lesioni neoplastiche riscontrate con diagnosi morfologica, positività a HER2 e Ki67. **Legenda:** † lesione border line.

Caso	Diagnosi morfologica	HER2	Ki67
1	carcinoma mucinoso	0	8,5% (-)
2	tumore misto benigno	1+	5,2% (-)
	adenoma tubulare complesso	0	4,3% (-)
	adenosi ed ectasia duttale	0	2,7% (-)
3	carcinoma solido	1+	23,6% (++)
4	carcinoma tubulare complesso	0	7,1% (-)
5	adenoma tubulare complesso	0	14,7% (+)
	†		

Tabella 6.3: Lesioni neopastiche

	adenoma tubulocistico complesso †	1+	5,2% (-)
6	adenoma cistopapillare	1+	16,6% (+)
7	adenoma papillare complesso	1+	10,4% (+)
8	carcinoma solido semplice	0	40,9% (+++)
9	carcinoma tubulosolido	0	5,5% (-)
10	carcinoma in situ	0	3,9% (-)
	carcinoma in tumore misto benigno	1+	21,3% (++)
	adenoma semplice	0	3,8% (-)
	adenosi e fibrosclerosi	1+	6,8% (-)
	adenosi ed ectasia duttale	0	1,2% (-)
11	carcinoma tubulare semplice †	1+	17,0% (+)
12	carcinoma papillare semplice	1+	14,3% (+)
13	carcinoma tubulosolido semplice	2+	21,2% (++)
14	carcinoma tubulosolido	0	3,5% (-)
	carcinoma solido	2+	29,1% (++)
15	adenoma tubulare complesso †	1+	2,2% (-)
16	adenoma tubulare complesso	0	9,9% (-)
17	adenoma tubulare complesso	0	24,5% (++)
	adenoma tubulare semplice	0	19,9% (+)
	adenoma tubulare complesso	0	12,3% (+)
	adenoma tubulare semplice	1+	13,8% (+)
18	adenosi e fibrosclerosi	1+	1,9% (-)
19	adenoma tubulopapillare semplice	2+	3,6% (-)
	adenoma tubulopapillare complesso	2+	9,6% (-)
20	adenoma tubulocistico semplice	0	9,6% (-)
	adenoma tubulare complesso	2+	6,0% (-)
21	carcinoma tubulare complesso	0	17,3% (+)
22	carcinoma tubulare complesso	0	14,5% (+)
	tumore misto benigno	0	15,9% (+)
23	adenoma tubulare complesso	1+	11,5% (+)
24	tumore misto benigno	2+	11,7% (+)

Tabella 6.3: Lesioni neopastiche

25	carcinoma tubulare complesso e mioepitelioma maligno	1+	1,1% (-)
26	carcinoma solido	0	49,5% (+++)
	carcinosarcoma	0	46,7% (+++)
27	tumore misto benigno	1+	6,2% (+)
28	carcinoma tubulare semplice	1+	10,1% (+)
29	carcinoma papillare semplice invasivo	1+	21,3% (++)
	adenoma tubulare complesso	1+	11,9% (+)
30	carcinoma tubulare complesso	1+	9,3% (-)
31	carcinoma papillare semplice †	1+	15,2%(+)
32	carcinoma tubulopapillare complesso	1+	11,4% (+)
33	carcinoma tubulosolido semplice	1+	13,2% (+)
34	carcinoma in tumore misto benigno	1+	11,7% (+)
35	carcinoma tubulopapillare semplice †	1+	7,5% (-)
36	carcinoma tubulare complesso †	0	3,1% (-)
37	carcinoma e mioepitelioma maligno	0	7,6% (-)
38	carcinoma tubulosolido complesso †	0	10,3% (+)
39	carcinoma in tumore misto benigno	1+	8,8% (-)
40	carcinoma adenosquamoso	0	12,2% (+)
41	carcinoma tubulare semplice	1+	18,9% (+)
42	carcinoma in tumore misto benigno	1+	13,4% (+)
	adenoma complesso	1+	1,4% (-)
	tumore misto benigno	1+	1,7% (-)
43	carcinoma tubolare complesso †	0	3,9% (-)
	carcinoma solido e mioepitelioma maligno	1+	18,1% (+)
44	adenoma tubolare semplice	0	3,6% (-)
45	adenoma tubulare complesso	1+	6,3% (-)
46	carcinoma complesso †	0	15,2% (+)

Tabella 6.3: Lesioni neopastiche

47	adenoma tubulare complesso	1+	5,2% (-)
48	adenoma tubulare complesso	1+	4,9% (-)
49	carcinoma tubulare complesso linfonodo con metastasi	0 1+	9,6% (-) 15,0% (+)
50	carcinoma complesso papillare	1+	26,8% (++)
51	adenoma tubulare complesso	0	7,5% (-)
52	tumore misto benigno adenoma tubulare complesso	1+ 2+	4,0% 4,7% (-)
53	carcinoma tubulare semplice carcinoma papillare complesso carcinoma solido linfonodo metastasi	1+ 2+ 2+ 2+	36,1% (++) 0,9% (-) 24,5% (++) 10,6% (103/500*) (+)
54	carcinoma tubulare complesso † carcinoma in tumore misto benigno carcinoma in tumore misto benigno	1+ 1+ 2+	16,7% (+) 15,8% (+) 17,8% (+)
55	carcinoma tubulo papillare adenoma tubulare complesso	1+ 2+	15,6% (+) 5,9% (-)
56	adenoma complesso	2+	18,3% (+)
57	adenoma papillare complesso	2+	18,6% (+)
58	adenoma tubulare semplice	1+	4,0% (-)
59	carcinoma tubulo papillifero complesso carcinoma tubulo papillifero complesso	0 1+	35,1% (++) 20,9% (++)
60	carcinoma tubulare complesso infiltrante	0	16,1% (+)

Nonostante i questionari di follow-up fossero stati spediti a tutte le strutture referenti i casi, si è avuta una scarsa risposta dei liberi professionisti con 14 risposte. In particolare 10 cagne sono tuttora in vita e non hanno sviluppato recidive né altri noduli mammari, 4 sono morte, ma solo 2 di queste a causa della patologia neoplastica (caso 8 e 33). L'esiguità dei dati non permette una elaborazione statistica degli stessi.

6.2 Valutazioni statistiche dei risultati

Le analisi statistiche effettuate hanno permesso di mettere in evidenza che non esistono differenze statisticamente significative tra l'espressione di HER2 nelle lesioni benigne e maligne ($P \leq 0,22$), tra lesioni maligne e displastiche ($P \leq 0,76$) e tra lesioni benigne e displastiche ($P \leq 0,22$). La correlazione tra l'espressione di HER2 nelle lesioni benigne e maligne è al limite del valore di significatività ($P \leq 0,15$), mentre tra lesioni maligne e displastiche non c'è correlazione ($P \leq 0,24$). Come ci si attende esiste, invece, una differenza altamente significativa tra lesioni maligne e benigne ($P \leq 0,0049$) e tra lesioni maligne e displastiche ($P \leq 1 \cdot 10^{-5}$) per quanto riguarda la percentuale di cellule positive a Ki-67 e non c'è differenza tra lesioni benigne e displastiche ($P \leq 0,055$).

Relativamente al confronto tra la positività ad HER2 e Ki-67 questo risulta avere una correlazione imperfetta positiva ($R=0,267$ $P \leq 0,012$) se si considerano tutte le lesioni insieme. La correlazione viene mantenuta se si considera il confronto all'interno del gruppo delle neoplasie maligne ($R=0,438$ $P \leq 0,0026$), mentre si perde all'interno del gruppo delle neoplasie benigne ($R=0,134$ $P \leq 0,43$).

Infine il confronto tra malignità della lesione ed espressione dei recettori ha evidenziato l'esistenza di una correlazione imperfetta positiva se si considera l'indagine di Ki-67 ($R=0,523$ $P \leq 1 \cdot 10^{-6}$), mentre per HER2 non esiste alcuna correlazione ($R=0,147$ $P \leq 0,17$).

Tabella 6.4: Tabella riassuntiva delle valutazioni statistiche tramite test di Wilcoxon.

	Gruppi valutati	P
HER2	B/M	$P \leq 0,22$
	M/D	$P \leq 0,76$
	B/D	$P \leq 0,22$
Ki-67	B/M	$P \leq 0,0049$
	M/D	$P \leq 1 \cdot 10^{-5}$
	B/D	$P \leq 0,055$

Tabella 6.5: Tabella riassuntiva delle valutazioni statistiche tramite test di correlazione di Spearman.

	Gruppi valutati	P
HER2	B/M	$P \leq 0,15$
	M/D	$P \leq 0,24$
Tutte le lesioni	HER2+/Ki-67+	$R=0,267 P \leq 0,012$
M		$R=0,438 P \leq 0,0026$
B		$R=0,134 P \leq 0,43$
Tutte le lesione	Malignità/HER2	$R=0,147 P \leq 0,17$
	Malignità/Ki-67	$R=0,523 P \leq 1 \cdot 10^{-6}$

Capitolo 7

DISCUSSIONE

L'analisi dei dati relativi al segnalamento delle cagne con tumore mammario conferma come le cagne abbiano un'età compresa tra i 9 e gli 11 anni (media 9,8 anni).[48] Per quanto riguarda la razza, invece, il nostro studio rileva una leggera preponderanza dei meticci che però probabilmente perde di significato se confrontato con il rapporto tra cani di razza e meticci se si considera tutta la popolazione canina e non solo quella di questa indagine. Nonostante il 32,76% degli individui sia sterilizzato al momento della mastectomia, si deve considerare che non si è riusciti a risalire alla effettiva età di ovariectomia e quindi probabilmente un ritardo nell'esecuzione dell'operazione spiega questo dato molto elevato. Risulta comunque che la pratica di sterilizzazione sia ancora poco diffusa nella popolazione canina.

Si conferma l'incidenza più alta delle lesioni neoplastiche/displastiche nelle mammelle più caudali (85% nelle tre paia caudali); sebbene non se ne conosca il motivo, alcuni autori imputano questo comportamento alla presenza di più tessuto ghiandolare. Si conferma l'assenza di preponderanza di una tra le due linee mammarie.[161, 174]

Infine la dimensione media della lesione al momento della rimozione (1,53 cm) permette di avere una prognosi più probabilmente favorevole a parità di altri fattori.[99, 181]

Il 30% dei soggetti presenta al momento della diagnosi, la presenza di più lesioni neoplastiche di natura uguale o diversa nella mammella, evento frequente nella specie canina. Il 57,15% delle lesioni è stata descritta di natura maligna dal punto di vista morfologico. Nonostante questa prevalenza, bisogna ricordare che alcune lesioni presentano caratteri "border line" che ne rendono difficile l'interpretazione. Infatti alla luce del risultato della colorazione IHC le diagnosi morfologiche sono state sottoposte a revisione da parte di due patologi i quali comunque erano all'oscuro del risultato ottenuto. Alcune diagnosi sono state messe in discussione come segnalato in tabella 6.3 (nel capitolo 6 Risultati), in particolare: nei caso 5 e 15 è stata messa in discussione la benignità delle lesioni, nel caso 11, 31, 35, 36, 38, 43, 46 e 54 al contrario, la malignità. In alcuni casi i dati relativi ai marker hanno confermato o meno la diagnosi ritenuta più corretta. Si ricorda infatti che la proliferazione è solo una delle variabili da prendere in considerazione nella valutazione della natura di

una lesione neoplastica.

L'utilizzo dell'immunocoloratore ha apportato una serie di vantaggi non dovendo più necessitare della presenza contemporanea di un controllo positivo o negativo durante la corsa delle colorazioni. I protocolli suggeriti dalla casa produttrice sono tarati per l'esecuzione dei test con gli anticorpi (Ab) di loro fabbricazione e su tessuti di origine umana, si è dovuto quindi testare diversi protocolli fino ad ottimizzare i protocolli sulla specie canina ed per l'utilizzo di Ab di altre ditte. Una volta raggiunto questo scopo la macchina esegue la colorazione in modo sequenziale e standard il che permette di limitare la variabilità legata alle manualità della procedura e la necessità di utilizzare sempre un controllo positivo che in ogni caso è stato aggiunto in numerose corse.

Il confronto tra la metodica automatica e quella manuale ha permesso di evidenziare una maggior velocità di esecuzione e ripetibilità della metodica tramite immunocoloratore. L'esecuzione dei test di ottimizzazione ha permesso di minimizzare la presenza di falsi positivi e negativi. La qualità del vetrino è migliorata soprattutto ai fini della diagnostica. I colori sono più contrastati permettendo una migliore distinzione delle positività, mentre si è ridotta molto la presenza del fondo.

Purtroppo la macchina lavora in maniera ottimale solo con il vetrini Superfrost® Plus. Le sezioni sui vetrini adiuvati con silano durante lo smascheramento tendono a rovinarsi o addirittura a staccarsi. Il problema è stato parzialmente risolto mettendo i vetrini in stufa a 37°C per circa 30 minuti prima della corsa.

La positività nei confronti di HER2 si è avuta nel 18% dei casi esaminati attestandosi ad un valore confrontabile con quelli della letteratura sebbene più basso.[35] Al contrario di quanto atteso, però, la positività interessa un significativo numero di lesioni definite benigne. Il dato si discosta dalle informazioni della letteratura nonostante la presenza di un lavoro che evidenzia il 50% di positività anche nelle lesioni benigne.[125]

La bassa positività riscontrata può essere spiegata dalla considerazione che è stato descritto in letteratura come l'antigenicità della proteina sia influenzata da diversi fattori tra cui il tempo di fissazione e di inclusione in paraffina.[124] I campioni risalgono ad un periodo a cavallo tra la fine del 2005 e l'inizio del 2006 per cui sono stati stoccati circa 1 anno in paraffina e almeno 48 ore in formalina vista la tempistica di processazione del laboratorio.

L'anticorpo utilizzato lega una porzione intracitoplasmatica della proteina umana, ma la cross-reattività sembra dimostrata dalla presenza di numerosi lavori della letteratura che utilizzano lo stesso clone e dall'omologia tra proteina umana e di cane che si attesta a più del 90%. Durante le fasi di preparazione della sperimentazione sono state effettuate prove con altri anticorpi che hanno dimostrato di reagire con la proteina del cane sebbene la colorazione fosse meno marcata. Per questo motivo si è scelto di continuare ad usare l'Ab policlonale della DAKO.

Per la valutazione della positività a HER2 si è utilizzato lo schema dell'Herceptest nonostante questo sia designato per l'esecuzione su tessuto umano.

Effettivamente le intensità e le percentuali di colorazione non hanno mai dato valori che permettessero di assegnare la classe 3+ alle lesioni indagate. Questo è dipeso soprattutto dal fatto che la popolazione tumorale non presenta di solito un pattern omogeneo di colorazione passando da zone che hanno le caratteristiche per giustificare una classe 3+ ad altre dove invece non si arriva nemmeno al 10% di cellule con colorazione parziale di membrana. Questa eterogeneità non sembra essere legata alla metodica di colorazione IHC in quanto la ripetizione della stessa porta ad un risultato sovrapponibile.

Durante l'esecuzione dell'indagine il metodo di valutazione ha dimostrato, purtroppo, di avere una gestione problematica della negatività in quanto la classe 1+ contiene una serie di lesioni caratterizzate da ampia eterogeneità comprendendo popolazioni cellulari dove la colorazione della membrana era quasi completa e altre nelle quali invece è appena accennata con ogni grado di intensità. In ogni caso la conta, come avviene in medicina umana, si è sempre basata su almeno il 10% di positività totale nella popolazione tumorale.

Inoltre dal punto di vista pratico la visualizzazione della colorazione di membrana è più difficile in quelle cellule che presentano scarso citoplasma e nucleo ipercromatico in quanto è estremamente semplice confondere una positività citoplasmatica con una positività di membrana incompleta.

In particolare la valutazione della positività di HER2 risulta più complicata per l'operatore rispetto a quella per altri marker (ad esempio per Ki-67) in particolare vista la maggior sensibilità ad artefatti legati alla conservazione del campione. Inoltre gioca un ruolo essenziale l'esperienza del patologo.

Una soluzione parziale a questo problema potrebbe risiedere nell'utilizzo di software per l'elaborazione delle immagini ottenute con il microscopio. Questa metodica è già ampiamente utilizzata in letteratura per la valutazione dei dati attraverso l'utilizzo di programmi sia con licenza proprietaria che con licenza GPL. L'adozione di queste tecnologie potrebbe velocizzare la valutazione di quei marker per i quali si tratta solo di effettuare il confronto numerico tra due popolazioni oppure semplificare quella di marker nei quali i parametri da prendere in considerazione sono più numerosi.

Altro punto interessante che meriterebbe di certo approfondimento è lo stato di espressione del tessuto di una mammella sana, infatti nelle sezioni indagate il tessuto mammario era nella quasi totalità dei casi in preda a fenomeni di iperplasia/displasia. L'attivazione del network di HER2 sembra essere un evento precoce nella carcinogenesi e che quindi sia presente nelle lesioni benigne e iperplastiche ma non nel tessuto sano non sottoposto a stimolazione. Purtroppo il reperimento di tessuto mammario sano non è semplice in quanto i liberi professionisti intervengono solo su mammelle che presentano alterazioni patologiche. Da questo punto di vista sarebbe interessante magari poter sfruttare quei casi di localizzazione paramammaria di altri tipi di lesioni come mastocitomi o cisti cheratiniche. Si sottolinea che nella letteratura a nostra disposizione non sono presenti dati relativi al confronto tra tessuto sano o displasico e tessuto neoplastico.

Naturalmente si deve anche considerare la possibilità che la neoplasia mammaria nella cagna abbia una biologia diversa dalla donna e che l'attivazione

di HER2, seppur presente, abbia un ruolo marginale, questo in parte emerge anche dal dato ottenuto che indica una certa positività anche nei tumori benigni.

Infine i dati di follow-up potrebbero portare nuove informazioni riguardo all'andamento della neoplasia, purtroppo il loro reperimento da parte dei liberi professionisti è molte volte un ostacolo insormontabile. Da questo punto di vista si rende necessario l'utilizzo di casistica interna ove possibile o di soggetti seguiti direttamente a fini sperimentali.

Per quanto riguarda Ki-67 si è confermato un ottimo marker per determinare il coefficiente di proliferazione della neoplasia e che correla in maniera significativa con la malignità delle lesioni. Risulta interessante la correlazione che esiste tra Ki-67 e HER2 soprattutto nell'ambito delle sole lesioni maligne. Questo dato sembra avvalorare l'ipotesi secondo la quale la sovraespressione di HER2 abbia effettivamente un significato prognostico anche nel tumore mammario del cane. Sulla base di tali dati in parte contrastanti e in parte concordanti con la letteratura si evidenzia certamente la necessità di estendere lo studio a un maggior numero di casi con i relativi dati di follow-up e di sottolineare la possibilità che un diverso sistema di classificazione della positività nel cane potrebbe avere un maggior significato biologico.

Appendice A

WHO Classificazione istologica dei tumori mammari del cane

1. Tumori maligni

- (a) Carcinoma non infiltrante (in situ)
Una neoplasia epiteliale con caratteristiche istologiche di malignità che non ha però attraversato la membrana basale.
- (b) Carcinoma complesso
Un carcinoma comprendente sia cellule epiteliali luminali che componenti mioepiteliali.
- (c) Carcinoma semplice
Un carcinoma comprendente un tipo di cellule rassomigliante le cellule epiteliali luminali o le cellule mioepiteliali
 - i. Carcinoma tubolopapillare
Un carcinoma caratterizzato dalla formazione di tubuli e/o proliferazioni papillari
 - ii. Carcinoma solido
Un carcinoma caratterizzato da una organizzazione di cellule tumorali in piani, cordoni o a forma di nido.
 - iii. Carcinoma anaplastico
Un carcinoma altamente infiltrante di cellule epiteliali pleomorfe che non sono classificabili in una delle altre categorie di carcinoma.
- (d) Tipi speciali di carcinoma
 - i. Carcinoma a cellule fusate (spindle cell)
Un tumore maligno composto da cellule spinose che sono organizzate in un pattern epiteliale.
 - ii. Carcinoma a cellule squamose
Un carcinoma composto da piani solidi e cordoni di cellule con aree di differenziazione squamosa.
 - iii. Carcinoma mucinoso
Un carcinoma caratterizzato da abbondante produzione di mucina.
 - iv. Carcinoma lipid-rich
Un carcinoma mammario caratterizzato da cellule con citoplasma abbondantemente vacuolato che contiene grosse quantità di grassi neutri.
- (e) Sarcoma
 - i. Fibrosarcoma
Un tumore maligno dei fibroblasti con quantità variabili di collagene.
 - ii. Osteosarcoma
Un sarcoma caratterizzato da osteoidi e/o formazioni ossee derivanti dalle cellule neoplastiche.
 - iii. Altri sarcomi
Condrosarcomi e liposarcomi puri sono estremamente rari.

- (f) Carcinosarcoma
Un tumore composto da cellule morfologicamente simili a componenti epiteliali maligne (luminali e/o mioepiteliali) e cellule simili a elementi maligni del tessuto connettivo; possono essere rilevate varie mescolanze di componenti carcinomatose e sarcomatose di tutti i tipi.
 - (g) Carcinoma o sarcoma nei tumori benigni
Tumori con foci di cellule con aspetto di malignità o noduli distinti di cellule di questo tipo presenti in adenomi complessi o tumori misti.
2. Tumori benigni
- (a) Adenoma
 - i. Adenoma semplice
Una neoplasia benigna di cellule epiteliali luminali o mioepiteliali ben differenziate.
 - ii. Adenoma complesso
Un tumore benigno composto da cellule epiteliali luminali insieme a cellule simili alle mioepiteliali.
 - iii. Adenoma basaloide (basaloid)
Un tumore benigno composto da cordoni o gruppi di cellule epiteliali basali monomorfe.
 - (b) Fibroadenoma
Un tumore benigno che contiene una mescolanza di cellule luminali epiteliali e cellule stromali; ogni tanto sono presenti anche cellule mioepiteliali.
 - i. Fibroadenoma a bassa cellularità
 - ii. Fibroadenoma ad alta cellularità
 - (c) Tumore benigno misto
Un tumore contenente in cellule di aspetto benigno simili alle componenti epiteliali (luminali e/o mioepiteliali) e alle cellule mesenchimali, le quali hanno prodotto cartilagine e/o tessuto osseo eventualmente insieme a tessuto fibroso.
 - (d) Papilloma duttale
Un tumore benigno sempliste o complesso, ramificato o lobulato, in un dotto ectasico.
3. Tumori non classificati
4. Iperplasia/Displasi mammaria
- (a) Iperplasia duttale
Una lesione non neoplastica caratterizzata dalla proliferazione intraduttale di cellule epiteliali; alcune volte porta alla parziale o totale obliterazione del lume per l'iperplasia epiteliale.

- (b) Iperplasia lobulare
 - i. Iperplasia epiteliale
Una proliferazione di cellule epiteliali all'interno dei dotti intra-lobulari.
 - ii. Adenosi
Una proliferazione non neoplastica dei dotti.
- (c) Cisti
- (d) Ectasia duttale
- (e) Fibrosi locale (fibrosclerosi)
- (f) Ginecomastia

Appendice B

Questionario utilizzato per la raccolta dei dati di follow-up

Appendice C

Tavole fotografiche

Tavola C.1: Carcinoma tubulare complesso, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)

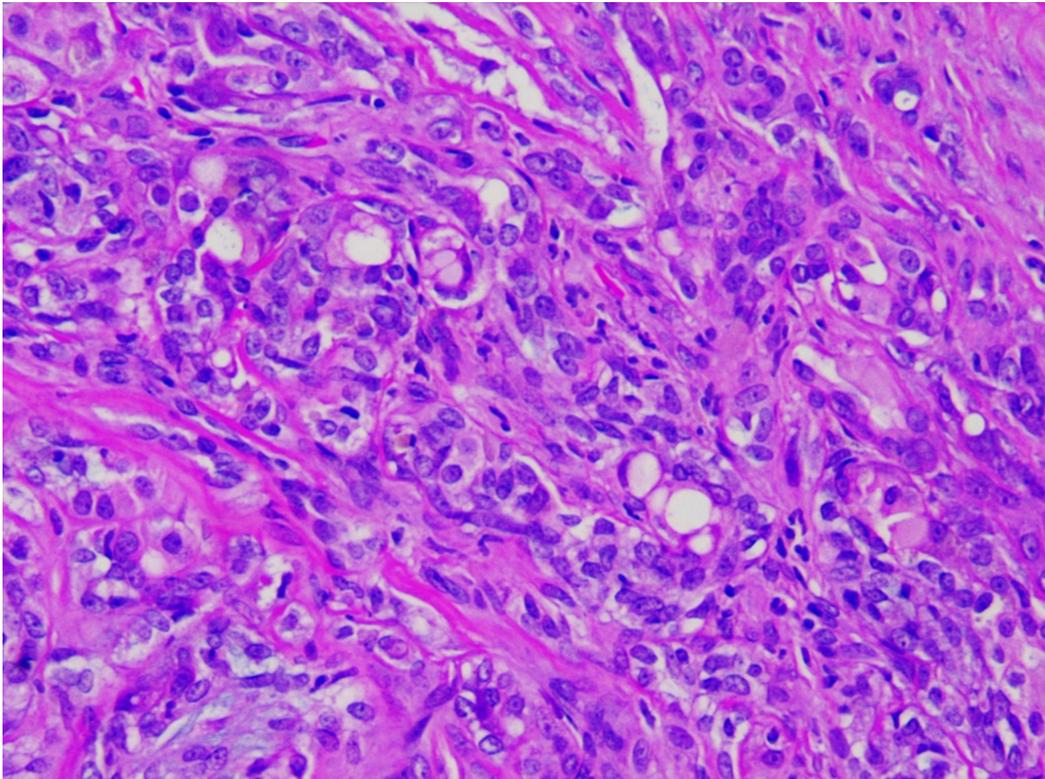


Tavola C.2: Carcinoma tubulare semplice, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)

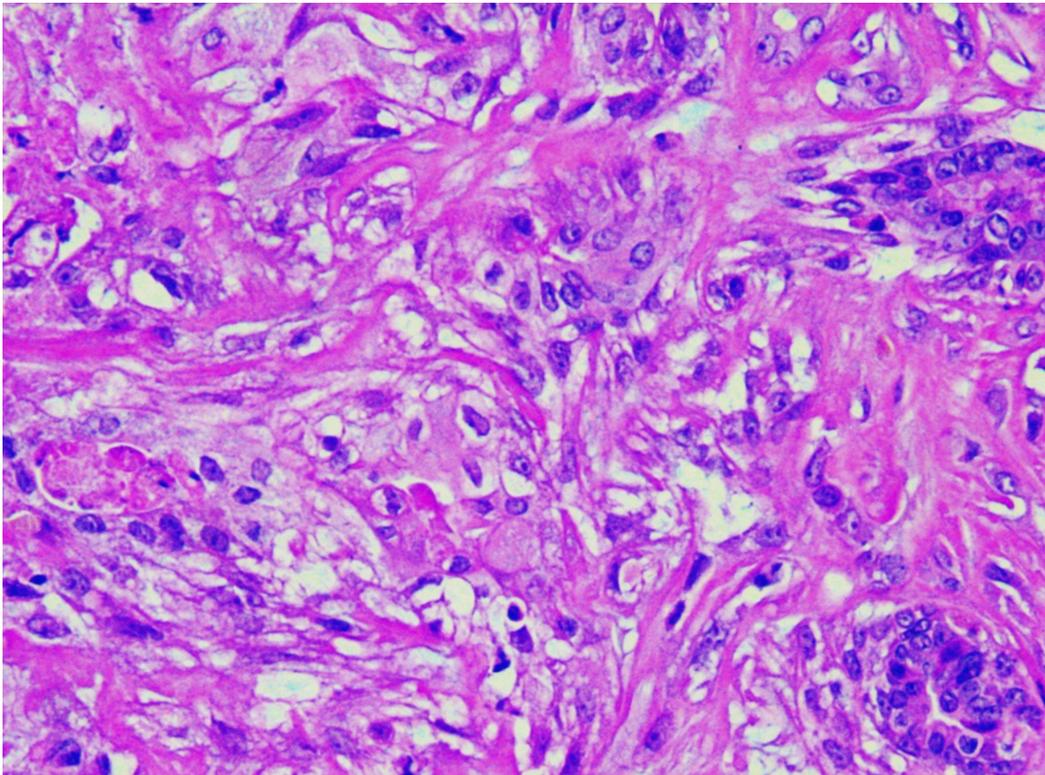


Tavola C.3: Carcinoma solido complesso con mioepitelioma maligno, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)

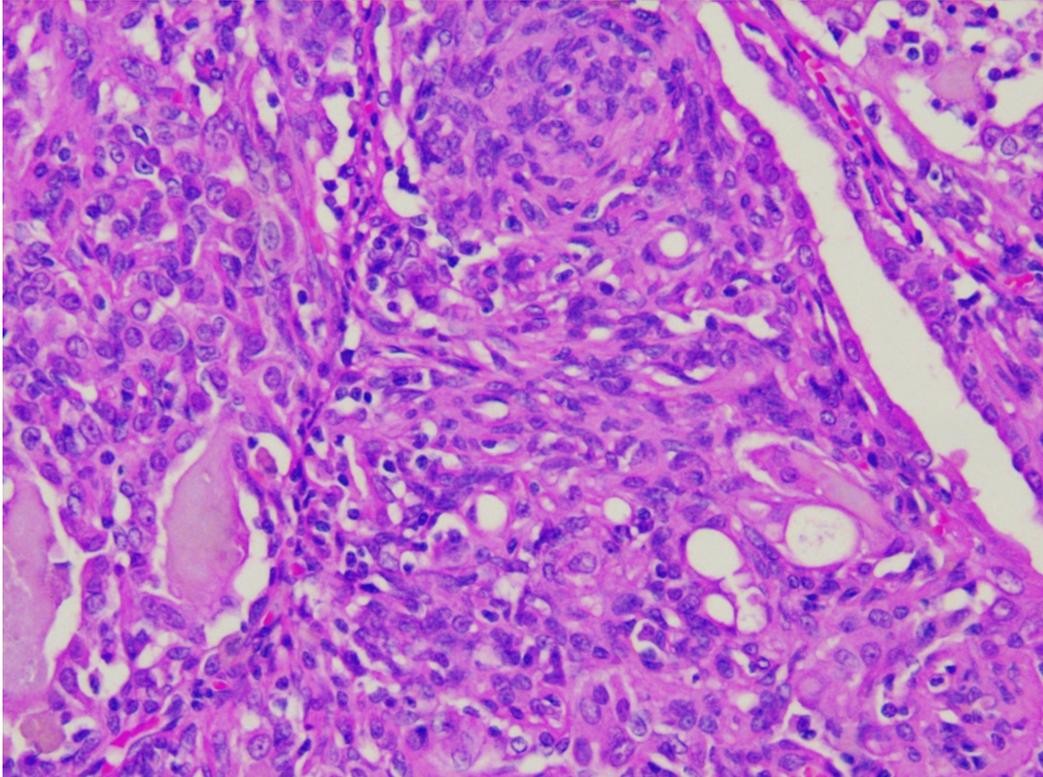


Tavola C.4: Carcinoma solido semplice con invasione dei vasi linfatici, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)

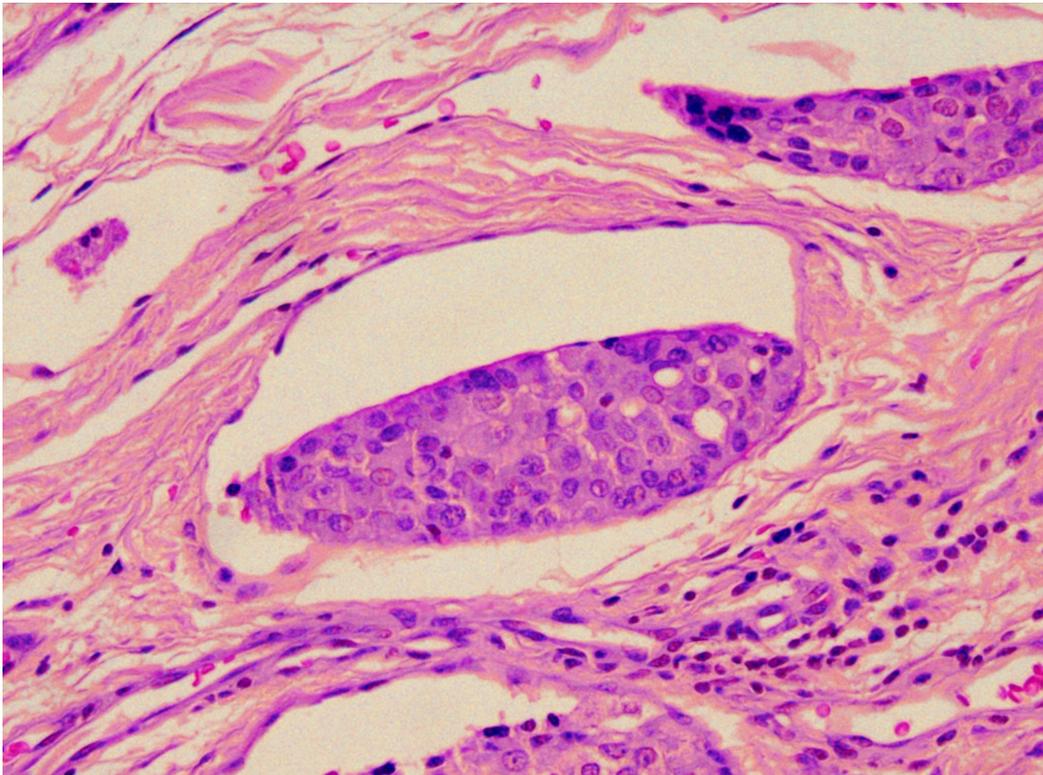


Tavola C.5: Adenoma tubulare complesso, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)

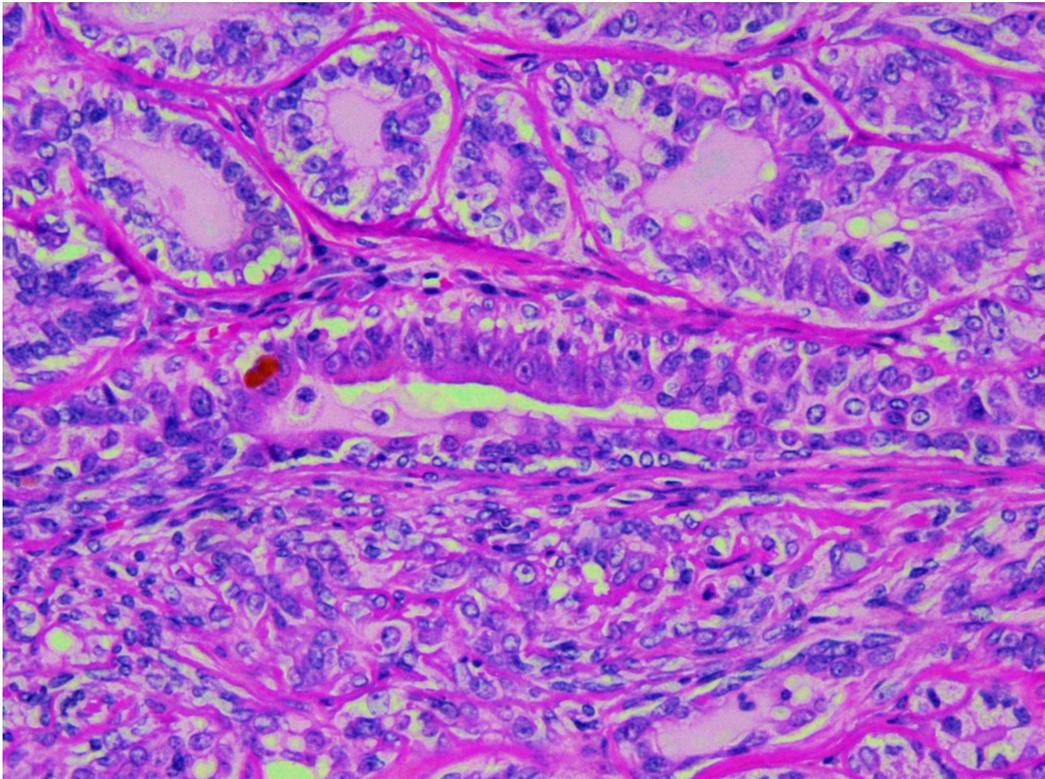


Tavola C.6: Adenoma tubulare semplice, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)

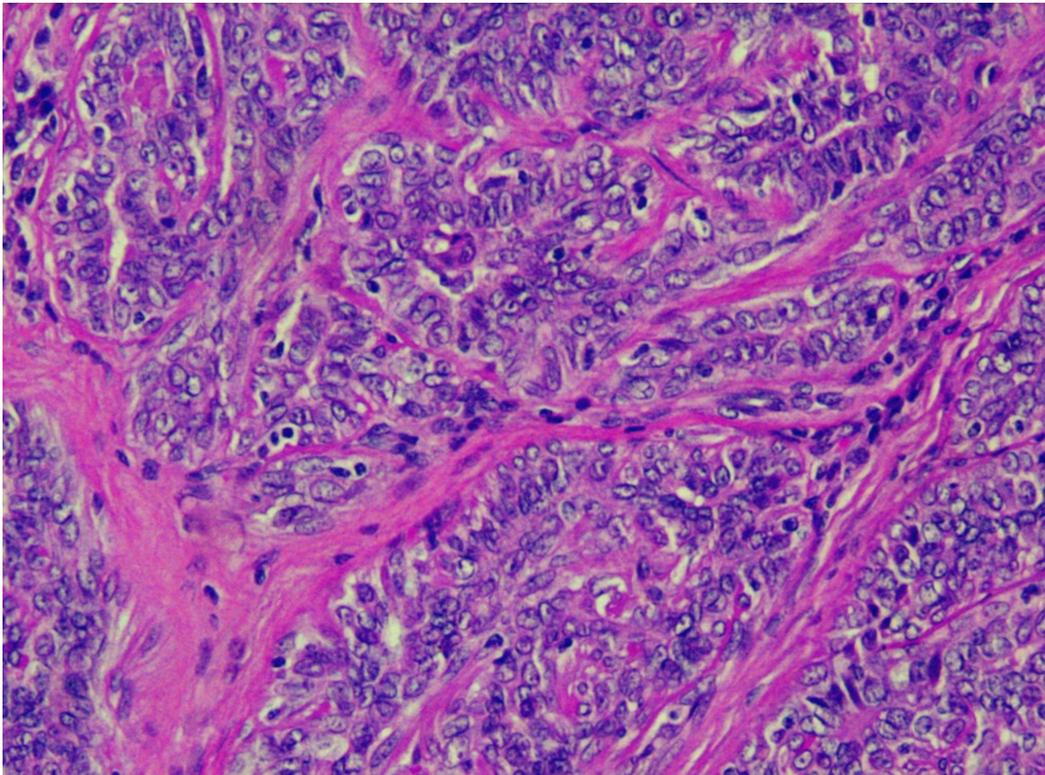


Tavola C.7: Controllo positivo per HER2 neoplasia mammaria 3+, ghiandola mammaria (20X)

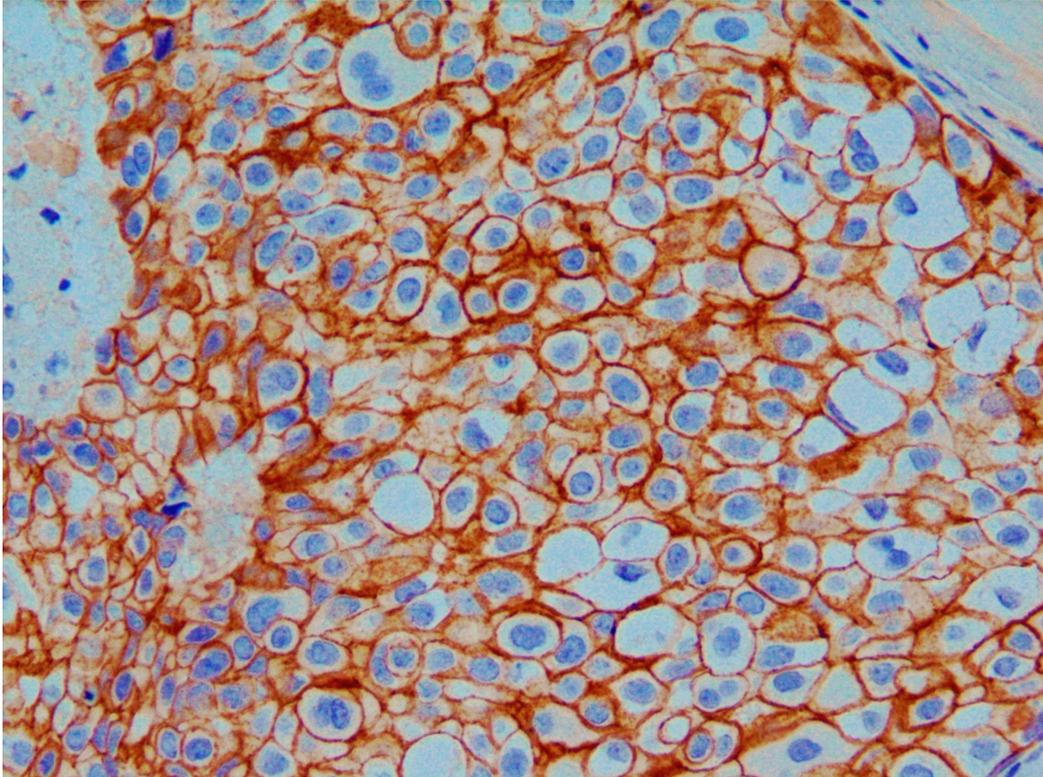


Tavola C.8: Controllo positivo per Ki-67 centro germinativo linfonodale, linfonodo cane (20X)

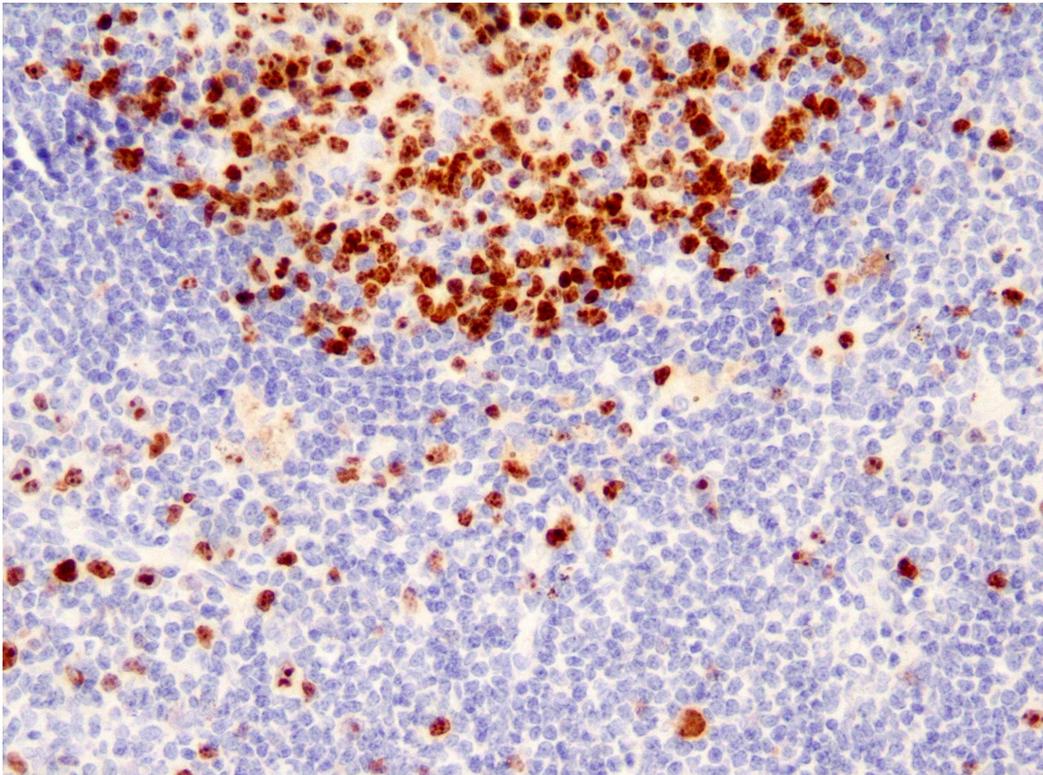


Tavola C.9: Adenoma tubulare complesso HER2 positivo 2+, caso 56, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)

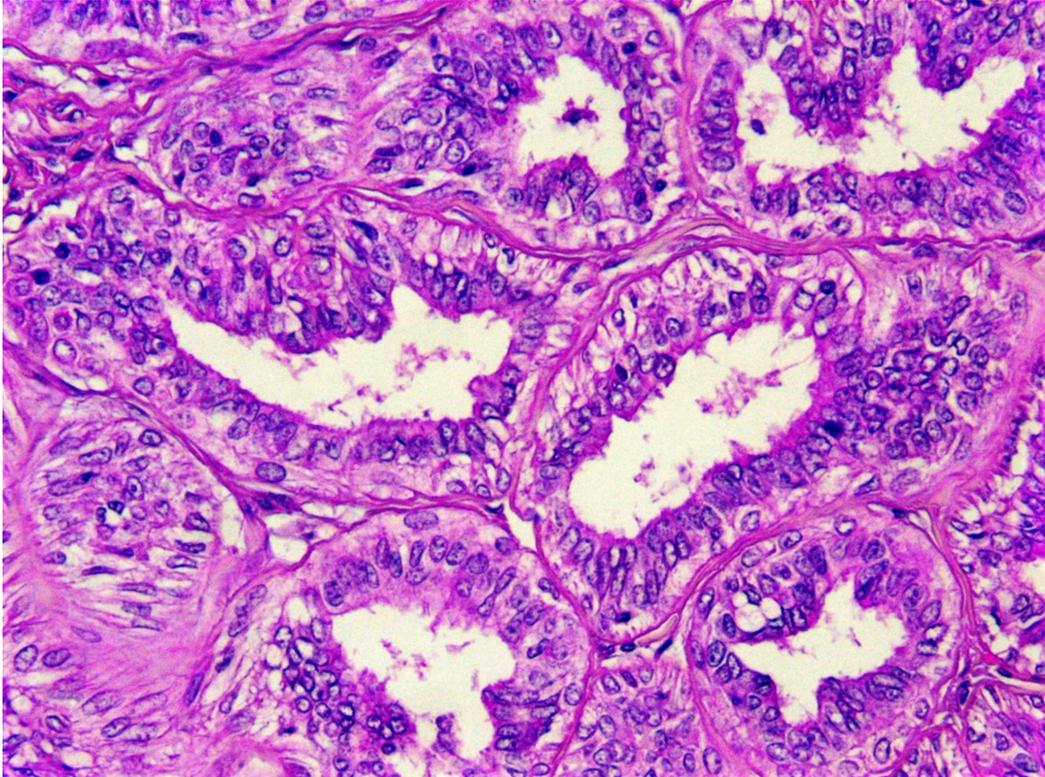


Tavola C.10: Adenoma tubulare complesso HER2 positivo 2+, caso 56, ghiandola mammaria cane (20X)

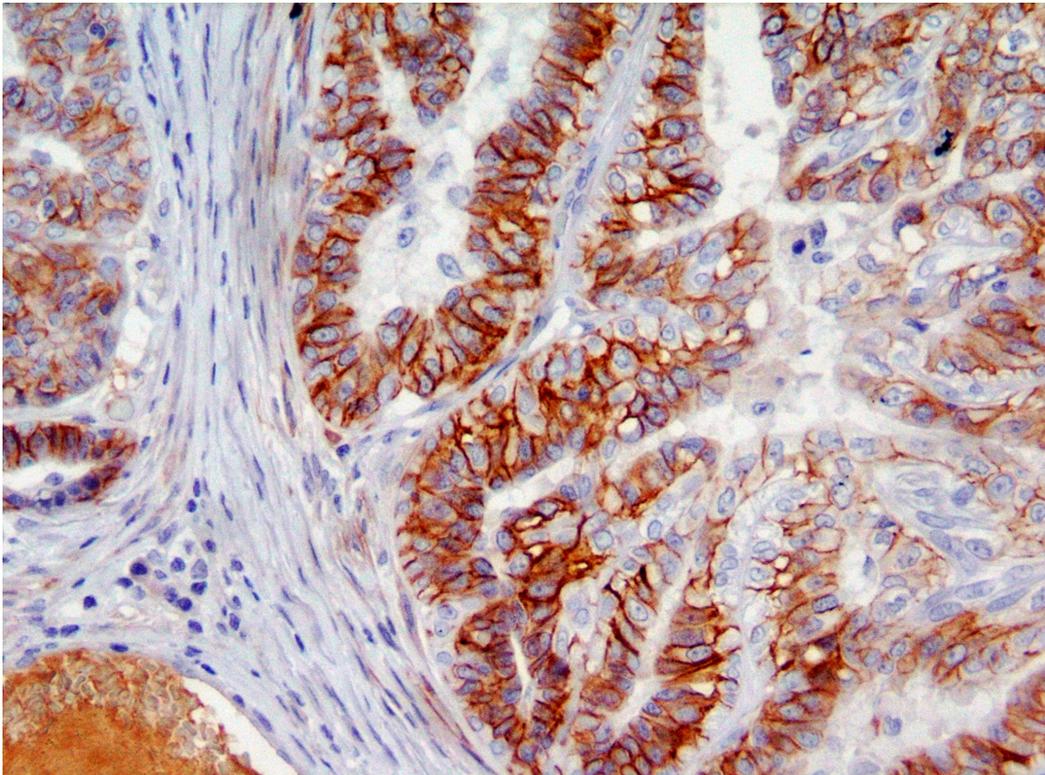


Tavola C.11: Adenoma tubulare complesso HER2 positivo 2+ colorazione per Ki-67, caso 56, ghiandola mammaria cane (20X)

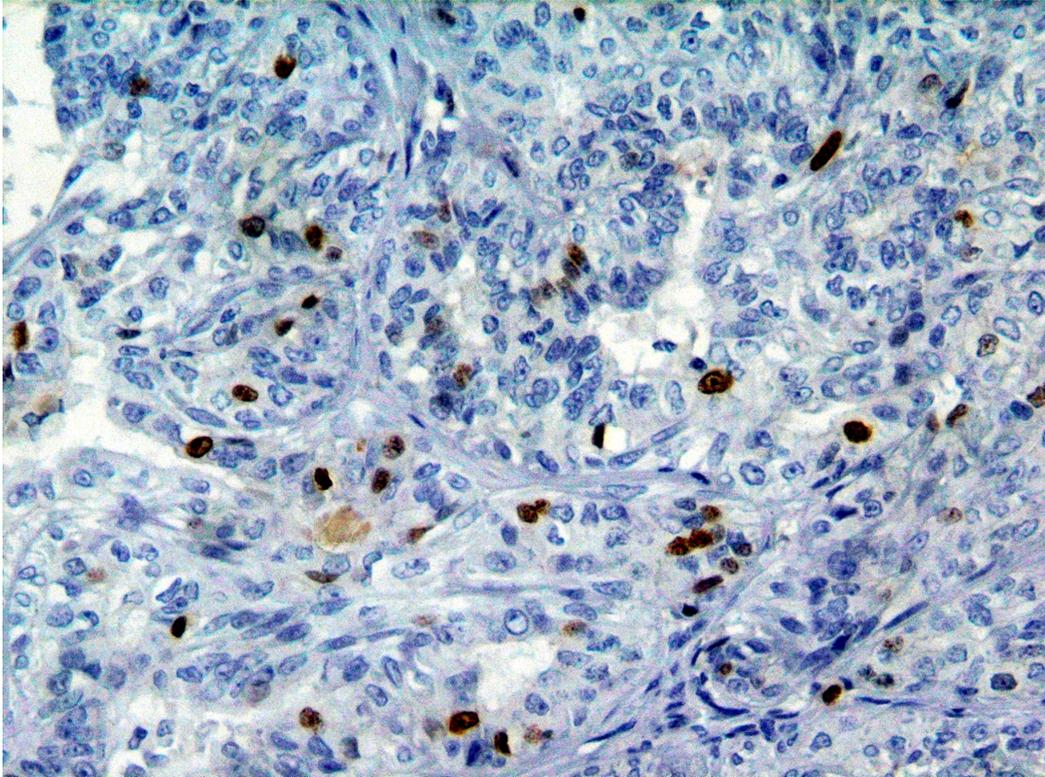


Tavola C.12: Carcinoma in tumore misto benigno HER2 positivo 2+, caso 54, ghiandola mammaria cane (H&E 20X)

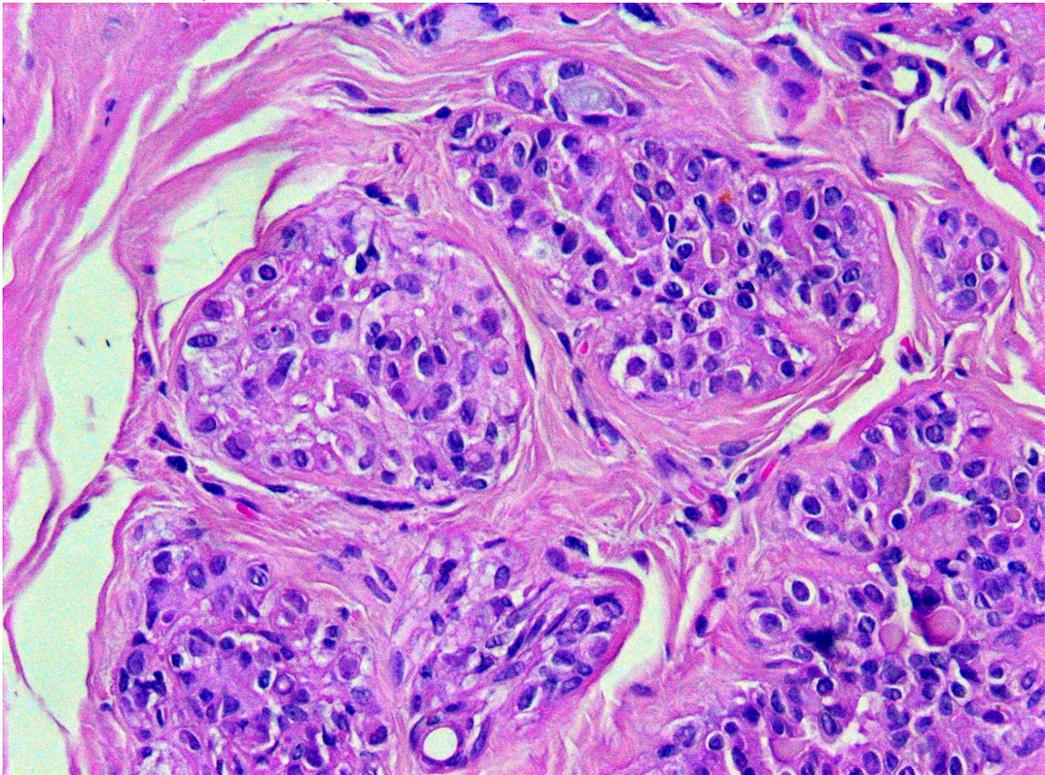


Tavola C.13: Carcinoma in tumore misto benigno HER2 positivo 2+, caso 54, ghiandola mammaria cane (20X)

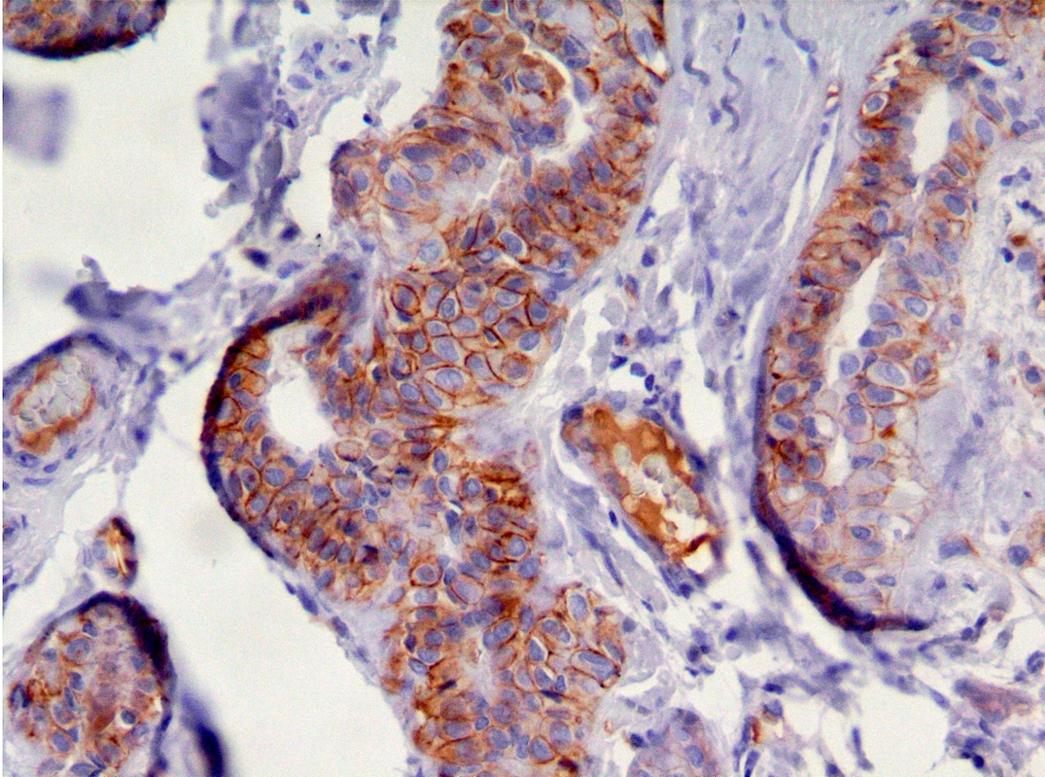
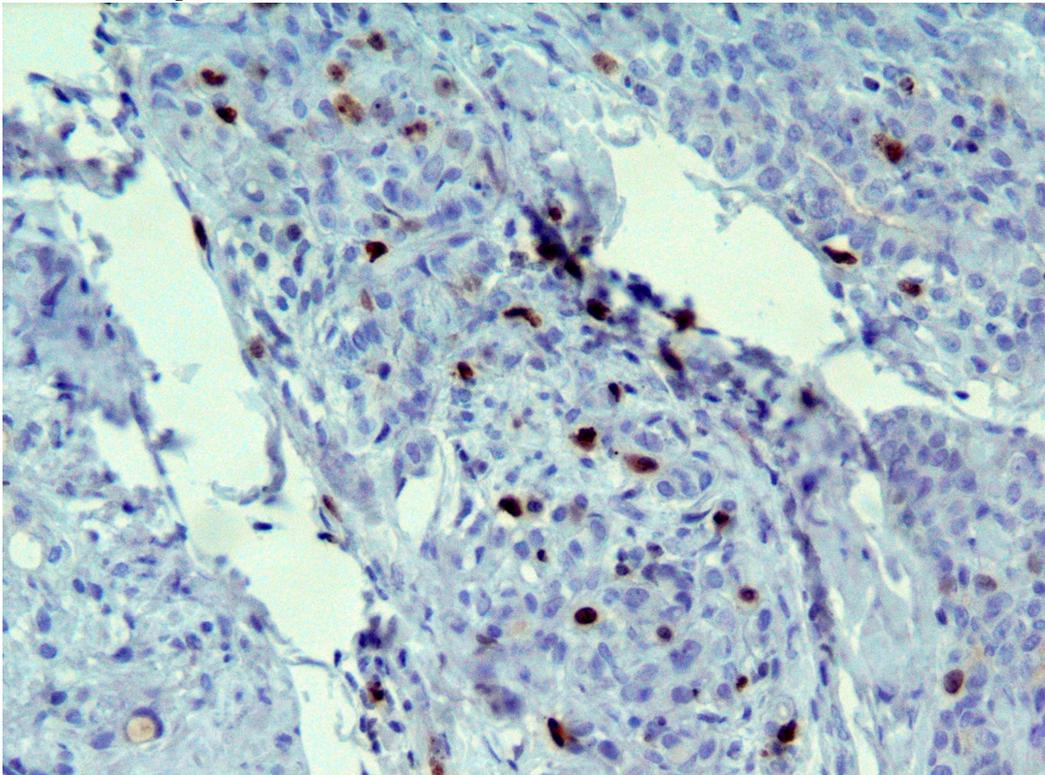


Tavola C.14: Carcinoma in tumore misto benigno HER2 positivo 2+ colorazione per Ki-67, caso 54, ghiandola mammaria cane (20X)



Bibliografia

- [1] T.E. Ahern, R.C. Bird, A.E. Bird, e L.G. Wolfe. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell line. *American Journal of Veterinary Research*, 57:693–696, 1996.
- [2] T. Akiyama, C. Sudo, H. Ogawara, K. Toyoshima, e T. Yamamoto. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 232:1644–1646, 1986.
- [3] S.W. Allen, K.W. Prasse, e E. Mahaffey. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 23:649–655, 1986.
- [4] K. Arai, S. Kaneko, M. Naoi, K. Suzuki, K. Maruo, e K. Uehara. Expression of stratified squamous epithelia-type cytokeratin by canine mammary epithelial cells during tumorigenesis. Type I (acidic) 57 kilodalton cytokeratin could be a molecular marker for malignant transformation of mammary epithelial cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 56:51–58, 1994.
- [5] K. Arai, K. Uehara, e M. Naoi. Expression of type II and type XI collagens in canine mammary mixed tumors and demonstration of collagen production by tumor cells in collagen gel culture. *Japanese Journal of cancer Research*, 80(9):840–847, 1989.
- [6] K. Arai, K. Uehara, e M. Naoi. Immunohistochemical examination of neural adhesion molecule (NCAM), tenascin and fibronectin on the development of cartilaginous tissue in canine mammary mixed tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, 56(4):809–811, 1994.
- [7] K. Arai, K. Uehara, e M. Naoi. Simultaneous expression of type IX collagen and an inhibin-related antigen in proliferative myoepithelial cells with pleomorphic adenoma of canine mammary glands. *Japanese Journal of cancer Research*, 86(6):577–584, 1995.
- [8] M.A. Attia. Cytological study of the anterior pituitary gland of senile untreated bitches with spontaneous mammary tumors. *Arch. Toxicol*, 50(1):34–45, 1982.
- [9] C. Benazzi, G. Sarzi, N. Galeotti, e P.S. Marcato. Basement membrane components in mammary tumours of the dog and the cat. *J. Comp. Pathol.*, 109(3):241–252, 1993.

- [10] S.A. Benjamin, A.C. Lee, e W.J. Saunders. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Veterinary Pathology*, 36(5):423–436, 1999.
- [11] D.E. Bostock. The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *Eur. J. Cancer*, 11:389–396, 1975.
- [12] M. Briggs. The beagle dog and contraceptive steroids. *Life Science*, 21(3):275–284, 1977.
- [13] R.S. Brodey, I.J. Fidler, e A.E. Howson. The relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy and pregnancy to the development of canine mammary gland neoplasms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 149(8):1047–1049, 1966.
- [14] A.M. Cameron e L.J. Faulkin. Hyperplastic and inflammatory nodules in canine mammary gland. *J. Natl. Cancer Inst.*, 47:1277–1287, 1971.
- [15] W.G. Cance, R.G. Craven, T.M. Weiner, e E.T. Liu. Novel protein kinase expression in human breast cancer. *Intl. J. Cancer*, 54(4):571–577, 1993.
- [16] P. Casalini, M.V. Iorio, E. Galmozzi, e S. Ménard. Role of HER receptors family in development and differentiation. *J. Cell. Physiol.*, 200:343–350, 2004.
- [17] C.E. Chrisp e W.L. Spangler. The canine malignant tumor as a model for the study of human breast cancer In *The canine as a Biomedical Research Model: Immunological, Hematological and Oncological Aspects*. A cura di Shifrine M. e Wilson P.D. U.S. Department of Energy, Washington D.C., 1980.
- [18] L.L. Chu, G.R. Rutteman, J.M. Kong, e et al. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. *Breast Cancer Research and Treatment*, 50(1):11–25, 1998.
- [19] L. Chung-Ho e K. Oh-Kyeong. Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *J. Vet. Sci.*, 3(4):321–325, 2002.
- [20] L. Chung-Ho, K. Wan-Hee, L. Ji-Hey, K. Min-Soo, K. Dae-Yong, e K. Oh-Kyeong. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J. Vet. Sci.*, 5(1):63–69, 2004.
- [21] P. Cohen, D.R. Clemmons, e R.G. Rosenfeld. Does the GH-IGF axis play a role in cancer pathogenesis? *Growth Horm. IGF Res.*, 10(6):297–305, 2000.
- [22] J.F. Couse e K.S. Korach. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.*, 20(4):358–417, 1999.

- [23] C.W. Daniel e G.B. Silberstein. Postnatal development of the rodent mammary gland In *The mammary gland: development, regulation and function*. A cura di M.C. Neville e C.W. Daniel, pp. 3–36. Plenum Press, New York, 1987.
- [24] K.M. Darcy, D. Zangani, A.L. Wolhueter, R.Y. Huang, M.M. Vaughan, J.A. Russel, e M.M. Ip. Changes in ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 and ErbB4 during growth, differentiation and apoptosis of normal rat mammary epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem*, 48:63–80, 2000.
- [25] J. Debnath, K.R. Mills, N.L. Collins, M.J. Reginato, S.K. Muthuswamy, e J.S. Brugge. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell*, 111:29–40, 2002.
- [26] E. Destexhe, L. Lespagnard, M. Degeyter, R. Heymann, e E. Coignoul. Immunohistochemical identification of myoepithelial and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 30(2):146–154, 1993.
- [27] E. Destexhe, P. Vanmanshoven, e F. Coignoul. Comparison of argyrophilic nuclear organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumors. *Amer. J. Vet. Res.*, 56(2):185–187, 1995.
- [28] I. Donnay, N. Devleeschouwer, P. Wouters-Ballman, G. Leclercq, e J.P. Versteegen. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal and neoplastic canine mammary tissue. *Research in Veterinary Science*, 60(3):251–254, 1996.
- [29] I. Donnay, J. Ravis, N. Devleeschouwer, P. Wouters-Ballman, e et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissue from dogs. *Amer. J. Vet. Res.*, 56(9):1188–1194, 1995.
- [30] I. Donnay, J. Ravis, P. Wouters-Ballman, N. Devleeschouwer, G. Leclercq, e J.P. Versteegen. Receptors for estrogen, progesterone and epidermal growth factors in normal and tumorous canine mammary tissue. *J. Reprod. Fert. Suppl*, 47:501–512, 1993.
- [31] C.R. Dorn e R. Schneider. Inbreeding and canine mammary cancer. A retrospective study. *J. Natl. Cancer Inst.*, 57(3):545–548, 1976.
- [32] C.R. Dorn, D.O.N. Taylor, F.L. Frye, e H.H. Hibbard. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California I. Methodology and description of cases. *J. Natl. Cancer Inst.*, 40(2):295–305, 1968.
- [33] M. Duchrow, C. Schluter, C. Wohlenberg, H.D. Flad, e J. Gerdes. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell. Prolif.*, 29:1–12, 1996.

- [34] V. Dulic, E. Lees, e S.I. Reed. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, 257:1958–1961, 1992.
- [35] A.P. Dutra, N.V.M. Granja, F.C. Schmitt, e G.D. Cassali. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37:1673–1681, 2004.
- [36] A. Egenvall, B.N. Bonnett, P. Öhagen, P. Olson, Å. Hedhammar, e H. von Euler. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80000 insured femal dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69:109–127, 2005.
- [37] H. Elling e F.R. Ungenach. Simultaneous occurrence of receptors for estradiol, progesterone and dihydrotestosterone in canine mammary tumors. *J. Cancer Res. Clin.*, 105:231–237, 1983.
- [38] E. Endl e J. Gerdes. The ki-67 protein: Fascinating forms and an unknown function. *Experimental Cell Research*, 257:231–237, 2000.
- [39] E. Endl e J. Gerdes. Post-translational modifications of the Ki-67 protein coincide with two major check points during mitosis. *J. Cell. Physiol.*, 182:371–380, 2000.
- [40] W.E. Engstrom, C. Barrios, E. Azawedo, G. Mollermark, L.E.Kangstorm, I. Eliason, e O. Larsson. Expression of c-myc in canine mammary tumors. *Anticancer Research*, 1:1235–1238, 1987.
- [41] S.S. Fernando, X. Wu, P. McKenzie, e et al. Immunohistochemical detection of p53 gene in canine mammary carcinoma: a study of 80 cases. *Pathology*, 27(4):365–369, 1995.
- [42] R. de Freitas Jr, M.V. Costa, S.V. Schneider, e et al. Accuracy of ultrasound and clinical examination in the diagnosis of axillary lymph node metastasis in breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 17:240–244, 1991.
- [43] M.I. Gallego, N. Binart, e G.W. Robinson et al. Prolactin, growth hormon and epidermal growth factor activate stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Dev. Biol.*, 229:163–175, 2001.
- [44] J. Gerdes, H. Lemke, H. Baish, H.H. Wacker, U. Schwab, e H. Stein. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody k-67. *J Immunol.*, 133:1710–1715, 1984.
- [45] J. Gerdes, U. Schwab, H. Lemke, e H. Stein. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Intl. J. Cancer*, 31:13–20, 1983.

- [46] S.R. Gilbertson, I.D. Kurzman, R.E. Zachrau, A.I. Hurvitz, e M.M. Black. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implication of morfologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*, 20(2):127–142, 1983.
- [47] R.M. Glasspool e T.R.J. Evans. Clinical imaging of cancer metastasis. *Eur. J. Cancer*, 36(13):1661–1670, 2000.
- [48] M.H. Goldschmidt, F.S. Shofer, e J.A. Smelstoys. Neoplastic lesion of mammary gland In *Pathobiology of the aging dog*. A cura di U. Mohr, pp. 168–178. Iowa State University Press, Ames IA, 2001.
- [49] M.A. Gonzales, S.E. Pinder, G. Callagy, e et al. Minichromosome maintenance protein 2 is a strong indipendet prognostic marker in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 21:4306–4313, 2003.
- [50] J.S. Goodwin, J.S. Samet, e W.C. Hunt. Determinants of survival in older cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, 88(15):1031–1038, 1996.
- [51] J.R. Grandis, S.D. Drenning, Q. Zeng, S.C. Watkins, M.F. Melhem, S. Endo, D.E. Johonson, L. Huang, Y. He, e J.D. Kim. Costitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:4227–4232, 2000.
- [52] D. Graus-Porta, R.R. Beerli, J.M. Daly, e N.E. Hynes. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.*, 16:1647–1655, 1997.
- [53] S.M. Griffey, B.R. Madewell, S.H. Dairkee, J.E. Hunt, D.K. Maydan, e R.J. Higgins. Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium specific cytokeratine antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. *Veterinary Pathology*, 30:155–161, 1993.
- [54] P.O. Hackel, E. Zwick, N. Prenzel, e A. Ullrich. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 11:184–189, 1999.
- [55] D.L. Hadsell e S.G. Bonnette. IGF and insulin action in the mammary gland: lesson from transgenic and knockout models. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 5(1):19–30, 2000.
- [56] S. Haga, M. Nakayama, e K. Tatsumi. Overexpression of the p53 gene product in canine mammary gland tumors. *Oncol. Rep.*, 8(6):1215–1219, 2001.
- [57] J.F. Hampe e W. Misdorp. Tumors and dysplasia of the mammary gland. *Bull. World Health Organ.*, 50:111–133, 1974.
- [58] D. Hanahan e R.A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57–70, 2000.

- [59] E. Hellmén. Characterization of four in vitro established canine mammary carcinoma and one atypical benign mixed tumor cell line. *In Vitro Cell Devel Biol*, 28A:309–319, 1992.
- [60] E. Hellmén. Canine mammary tumour cell lines established in vitro. *J. Reprod. Fert. Suppl*, 47:489–499, 1993.
- [61] E. Hellmén, R. Bergstrom, L. Holmberg, I.B. Spangberg, K. Hansson, e A. Lindgren. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology*, 30:20–27, 1993.
- [62] E. Hellmén e A. Lindgren. The accuracy of cytology in diagnosis and DNA analysis of canine mammary tumours. *J. Comp. Pathol.*, 101:443–450, 1989.
- [63] E. Hellmén e A. Lindgren. The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumours. *Veterinary Pathology*, 26(5):420–428, 1989.
- [64] E. Hellmén, A. Lindgren, F. Linell, P. Mattson, e A. Nilsson. Comparison of histology and clinical variables to DNA ploidy in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 25:219–226, 1988.
- [65] E. Hellmén, M. Moller, M.A. Blankenstein L. Andersson, e R. Westermark. Expression of different phenotype in cell lines from canine spindle-cell tumors and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin. *Breast Cancer Research and Treatment*, 61:197–210, 2000.
- [66] E. Hellmén e S. Svensson. Progression of canine mammary tumours as reflected by DNA ploidy in primary tumors and their metastases. *J. Comp. Pathol.*, 113(4):327–342, 1995.
- [67] U. Hinrichs, G.R. Rutteman, e H. Nederbragt. Stromal accumulation of chondroitin sulphate in mammary tumors of dogs. *British Journal of Cancer*, 80(9):1359–1365, 1999.
- [68] K. Hofmann e P. Bucher. The FHA domain: a putative nuclear signaling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem. Sci.*, 20:347–349, 1995.
- [69] T. Holbro, G. Civenni, e N.E. Hynes. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research*, 284:99–110, 2003.
- [70] G.N. Hortobagyi. Overview of treatment results with trastuzumab (herceptin) in metastatic breast cancer. *Semin. Oncol.*, 28:21–29, 2001.
- [71] B.S. Hulka, T.L. Edison, e R.A. Lininger. Steroid hormones and risk of breast cancer. *Cancer*, 74(3 suppl.):1111–1124, 1994.

- [72] Y. Izumi, L. Xu, E. di Tomaso, D. Fukumura, e R.K. Jain. Tumor biology: herceptin act as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*, 416:279–280, 2002.
- [73] C.B. Jannot, R.R. Beerli, S. Mason, W.J. Gullick, e N.E. Hynes. Intracellular expression of a single-chain antibody directed to the EGFR leads to growth inhibition of tumor cells. *Oncogene*, 13:275–282, 1996.
- [74] L. Jardines, M. Weiss, e B. Fowble. Neu (c-erbB-2/HER 2) and the epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer. *Pathobiology*, 61:268–282, 1993.
- [75] I.R. Kill. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus: evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J. Cell. Sci.*, 109:1253–1263, 1996.
- [76] H.E. König, H.G. Liebich, e J. Haierl. *Anatomia dei mammiferi domestici. Testo atlante a colori*. Piccin Nuova Libreria, 2006.
- [77] R.P. Kwapiem, R.C. Giles, R.G. Geil, e H.W. Casey. Basaloid adenomas of mammary gland in beagle dogs administered investigational steroids. *J. Natl. Cancer Inst.*, 59(3):933–939, 1977.
- [78] M. La Guardia e M. Giammarco. Breast cancer and obesity. *Panminerva Med.*, 43(2):123–133, 2001.
- [79] A. Langenbach, P. McManus, M. Hendrick, e et al. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional methods for evidence metastasis in dogs and cats with solid tumors. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 218(9):1424–1428, 2001.
- [80] E. Laughner, P. Taghavi, K. Chiles, P.C. Mahon, e G.L. Semenza. HER2(neu) signaling increase the rate of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol.*, 21:3995–4004, 2001.
- [81] K.F. Lee, H. Simon, H. Chen, B. Bates, M.C. Hung, e C. Hauser. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature*, 378:394–398, 1995.
- [82] L. Lespagnard, R. Kiss, A. Danguy, N. Legros, G. Lenger, N. Devleeschouwer, e R. Paridaens. In vitro studies of canine mammary tumors: influence of 17- β -estradiol and progesterone on cell-kinetic parameters. *Oncology*, 44(5):292–301, 1987.
- [83] J. Liang, J. Zubovitz, T. Petrocelli, R. Kotchetkov, M.K. Connor, K. Han, J.H. Lee, S. Ciarallo, C. Catzavelos, R. Beniston, E. Franssen, e J.M. Slingerland. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat. Med.*, 8:1153–1160, 2002.

- [84] P. Lipponen. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocr. Relat. Cancer*, 6:13–16, 1999.
- [85] C.V. Lohr, J.P. Teifke, K. Failing, e E. Weiss. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Veterinary Pathology*, 34:212–221, 1997.
- [86] E.G. Mac Ewen e S.J. Withrow. Tumor of the mammary gland In *Clinical Veterinary Oncology*. A cura di S.J. Withrow e E.G. MacEwen, pp. 292–304. J.B. Lippincott Company, San Francisco, 1989.
- [87] P.S. Marcato e G. Sarli. Neoplasie mammarie In *Patologia sistematica veterinaria*. A cura di P.S. Marcato, capitolo 11, pp. 1071–1093. Edagricole, 2002.
- [88] M.D. Marmor, K.B. Skaria, e Y. Yarden. Signal transduction and oncogenesi by ErbB7HER receptors. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 58(3):903–913, 2004.
- [89] P.M. Martin, M. Cotard, J.P. Mialot, e et al. Animal models for hormone dependent human breast cancer. relationship between steroid acceptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 12(1):13–17, 1984.
- [90] J. Martín de las Mulas, M. van Niel, Y. Millán, J. Ordás, M.A. Blackenstein, F. van Mill, e W. Misdorp. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesion: comparison with biochemical assay. *Domestic Animal Endocrinology*, 18:111–125, 2000.
- [91] B.A. Miller, L.N. Kolonel, L. Bernstein, e et al. Racial/ethnic patterns of cancer in the United States 1988-1992 In *SEER Monograph National Cancer Institute*. A cura di M.D. Bethesda. U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1996.
- [92] R. Millikan, B. Hulka, A. Thor, Y. Zang, S. Edgerton, X. Zhang, H. Pei, M. He, L. Wold, L.J. Melton, D. Ballard, K. Conway, e E. Liu. p53 mutations in benign breast tissue. *J. Clin. Oncol.*, 13:2293–2300, 1995.
- [93] W. Misdorp. Canine mammary tumors: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet. Quartely*, 10(1):26–33, 1988.
- [94] W. Misdorp. Prostagens and mammary tumors in dog and cats. *Acta Endocr (Copenhagen)*, 125(1 suppl):27–31, 1991.
- [95] W. Misdorp. Tumors of the mammary gland In *Tumors of the mammary gland*. A cura di D.J. Meuten, capitolo 12, pp. 575–607. Iowa State University Press, Ames IA, 4th edizione, 2002.

- [96] W. Misdorp, E. Cotchin, J.F. Hampe, A.G. Jabara, e J. von Sandersleben. Canine malignant mammary tumors, I: sarcomas. *Veterinary Pathology*, 8:99–112, 1971.
- [97] W. Misdorp, E. Cotchin, A.G. Jabara, e J. von Sandersleben. Canine malignant mammary tumors, III: special types of carcinomas, malignant mixed tumors. *Veterinary Pathology*, 10:241–256, 1973.
- [98] W. Misdorp, E. Cotchin, e J. von Sandersleben. Canine malignant mammary tumors, II: adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. *Veterinary Pathology*, 9:447–470, 1972.
- [99] W. Misdorp, R.W. Else, E. Hellmén, e et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. In *WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals*, volume 7 di 2nd. Armed Force Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 2001.
- [100] W. Misdorp e A.A.M. Hart. Canine mammary cancer. II. Therapy and caudes of death. *J. Small Anim. Pract.*, 20:395–404, 1979.
- [101] L. Moe. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 57:439–443, 2001.
- [102] J.A. Mol, S.C. Henzen-Logmans, P.H. Hageman, W. Misdorp, M.A. Blackenstein, e A. Rijnberk. Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80(10):3094–3096, 1995.
- [103] J.A. Mol, E. Van Garderen, P.J. Selman, J. Wolfswinkel, A. Rijnberk, e G.R. Ruttemanman. Growth hormone mRNA in mammary gland tumours of dogs and cats. *Clin. Invest.*, 95(5):2028–2034, 1995.
- [104] J.A. Mol, I.S. van Leeuwen, E. van Garderen, e et al. Mammary growth hormone and tumorigenesis - lesson from the dog. *Vet. Quartely*, 21(4):111–115, 1999.
- [105] A.W. Monlux, J.F. Roszel, D.W. Mc Vean, e T.W. Palmer. Classification of epithelial mammary tumors in a defined population. *Veterinary Pathology*, 14:194–217, 1977.
- [106] J.E. Moulton. Tumors of the mammary gland In *Tumors in Domestic Animals*. A cura di Moulton J.E. ed., pp. 518–522. Univ. California Press, Berkeley, 3rd edizione, 1990.
- [107] J.E. Moulton, L.S. Rosenblatt, e M. Goldman. Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Veterinary Pathology*, 23(6):741–749, 1986.
- [108] S.K. Muthuswamy, D. Li, S. Lelievre, M.J. Bissell, e J.S. Brugge. ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat. Cell Biol.*, 3:785–792, 2001.

- [109] T. Muto, S. Wakui, H. Takahashi, S. Maekawa, T. Masaoka, S. Ushigome, e M. Furusato. p53 gene mutation occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology*, 37:248–253, 2000.
- [110] V.R. Nerurkar, C.S. Ishwad, R. Seshadri, S.N. Naik, e V.S. Lalitha. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in normal canine mammary gland and in mammary tumours and their correlation with oestrogen receptors. *J. Comp. Pathol.*, 102(2):191–195, 1990.
- [111] A. Nieto, L. Pena, e M.D. Perez Alenza. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathological association and prognostic significance. *Veterinary Pathology*, 37(3):239–247, 2000.
- [112] A. Nieto, M.D. Pérez-Alenza, N. Del Castillo, E. Tabanera, M. Castano, e L. Pena. BRCA1 expression in canine mammary dysplasia and tumours: relationship with prognostic variables. *J. Comp. Pathol.*, 128:260–268, 2003.
- [113] P. Nurse. Universal control mechanism regulating cell cycle timing of M-phase. *Nature*, 344:503–508, 1990.
- [114] A.J. Obaya e J.M. Sedivy. Regulation of cyclin-cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59:126–142, 2002.
- [115] M.A. Olayioye, R.M. Neve, H.A. Lane, e N.E. Hynes. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal*, 19(13):3159–3167, 2000.
- [116] L. Pena, M. Castana, M.A. Sanchez, A. Rodrigues, e J.M. Flores. Immunohistochemical study of type IV collagen and laminin in canine mammary tumors. *Zentralbl Veterinarmed A*, 42(1):50–61, 1995.
- [117] S.V. Pena, M.F. Meisler, e C.A. Cartwright. Elevated c-Yes tyrosine kinase activity in premalignant lesion of the colon. *Gastroenterology*, 108(1):117–124, 1995.
- [118] D. Perez Alenza, G.R. Rutteman, L. Pena, e et al. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J. Vet. Intern. Med.*, 12(3):132–139, 1998.
- [119] M.D. Perez Alenza, G.R. Rutteman, N.J. Kuipers-Dijkshoorn, L. Pena, A. Montoya, W. Misdorp, e C.J. Cornelisse. DNA flow cytometry of canine mammary tumours: the relationship of DNA ploidy and S-phase in relation to clinical and histological features. *Research in Veterinary Science*, 58:238–243, 1995.

- [120] M.D. Perez Alenza, E. Tabanera, e L. Pena. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 219(8):1110–1114, 2001.
- [121] R. Preziosi, G. Sarli, C. Benazzi, e P.S. Marcato. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *J. Comp. Pathol.*, 113(4):301–313, 1995.
- [122] L.T. Pulley. Ultrastructural and histochemical demonstration of myoepithelium in mixed tumors of canine mammary gland. *American Journal of Veterinary Research*, 34(12):1513–1522, 1973.
- [123] B. Restucci, G. De Vico, e P. Maiolino. Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 37(4):297–301, 2000.
- [124] J.S. Ross e J.A. Fletcher. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*, 16:413–428, 1998.
- [125] A. Rungsipipat, S. Tateyama, R. Yamaguchi, K. Uchida, N. Miyoshi, e T. Hayashi. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, 61(1):27–32, 1999.
- [126] I.H. Russo e J. Russo. Prostaglandins and mammary development: differentiation versus carcinogenesis. *Acta Endocr (Copenhagen)*, 125:7–12, 1991.
- [127] J. Russo e I.H. Russo. Biology of disease. Biological and molecular basis of mammary carcinogenesis. *Lab. Invest*, 75(2):112–137, 1987.
- [128] G.R. Rutteman. Hormones and mammary tumor disease: an update. *In Vivo*, 4(1):33–40, 1990.
- [129] G.R. Rutteman. Contraceptive steroids and the mammary gland. is there a hazard? *Breast Cancer Research and Treatment*, 23:29–41, 1992.
- [130] G.R. Rutteman. Mammary tumors in the dog In *Current veterinary therapy*. A cura di R.W. Kirk, pp. 518–523. W.B. Saunders Co, 1997.
- [131] G.R. Rutteman, M.M. Bevers, W. Misdorp, e W.E. van den Brom. Anterior pituitary function in female dogs with mammary tumors. II. Prolactin. *Anticancer Research*, 9(1):241–246, 1989.
- [132] G.R. Rutteman, C.J. Cornelisse, N.J. Dijkshoorn, J. Poortman, e W. Misdorp. Flow cytophotometric analysis of DNA ploidy in canine mammary tumors. *Cancer Res.*, 48:3411–3417, 1988.

- [133] G.R. Rutteman e W. Misdorp. Hormonal background af canine and feline mammary tumors. *J. Reprod. Fert. Suppl*, 47:483–487, 1993.
- [134] G.R. Rutteman, W. Misdorp, M.A. Blankenstein, e W.E. van den Brom. Oestrogen (ER) and progesterin receptor (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *British Journal of Cancer*, 58(5):594–599, 1988.
- [135] G.R. Rutteman, W. Misdorp, W.E. van den Brom, e A. Rijnberk. Anterior pituitary function in female dogs with mammary tumors. I. Growth hormone. *Anticancer Research*, 9(1):235–239, 1989.
- [136] G.R. Rutteman, N. Willekes-Koolschijn, M.M. Bevers, A.A. Van der Gugten, e W. Misdorp. Prolactine binding in benign and malignant mammary tissue of female dogs. *Anticancer Research*, 6:829–835, 1986.
- [137] A.A. Sahin. Biologic and clinical significance of HER-2/neu (c-erbB-2) in breast cancer. *Adv. Anat. Pathol.*, 7:158–166, 2000.
- [138] J.R. Sainsbury, J.R. Farndon, G.K. Needham, A.J. Malcolm, e A.L. Harris. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from brest cancer. *Lancet*, 1(8547):1398–1402, 1987.
- [139] K.A. Schater, G. Kelly, R. Schrader, C. Griffith, A. Muggenburg, A. Tierney, J.F. Lechner, E.B. Janorvitz, e F.F. Hahn. A canine model of familial mammary carcinoma. *Veterinary Pathology*, 35:168–177, 1998.
- [140] C. Schluter, M. Duchrow, C. Wohlenberg, M.H. Becker, G. Key, H.D. Flad, e J. Gerdes. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J. Cell Biol.*, 123:513–522, 1993.
- [141] F.C. Schmitt, P. Figueirede, e M. Lacerda. Expression of c-erbB-2 protein and DNA ploidy in breast carcinogenesis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 119:815–820, 1995.
- [142] R. Schneider. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, 26(2):419–426, 1970.
- [143] R. Schneider, C.R. Dorn, e D.O.N. Taylor. Factors influencing canine mammary cancer development and post-surgical survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, 43(6):1249–1261, 1969.
- [144] T. Scholzen e J. Gerdes. The ki-67 protein: from the known ant the unknow. *J. Cell. Physiol.*, 182:311–322, 2000.
- [145] P.J. Selman, J.A. Mol, G.R. Rutteman, E. Van Garderen, e A. Rijnberk. Progesterin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*, 134(1):287–292, 1994.

- [146] C.J. Sherr. D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.*, 20:187–190, 1995.
- [147] C.J. Sherr. The pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.*, 60:3689–3695, 2000.
- [148] C.J. Sherr e J.M. Roberts. CDK inhibitors: positive and negative regulators of g1-phase progression. *Genes Dev.*, 13:1504–1512, 1999.
- [149] F.S. Shofer, E.G. Sonnenschein, e M.H. Goldschmidt. Histopatologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, 13(1):49–60, 1989.
- [150] P.M. Siegel, E.D. Ryan, R.D. Cardiff, e W.J. Muller. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenica mice: implications for human breast cancer. *EMBO J.*, 18:2149–2164, 1999.
- [151] D.J. Slamon, G.M. Clark, S.G. Wong, W.J. Levin, A. Ullrich, e W.L. McGuire. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235:177–182, 1987.
- [152] E.G. Sonnenschein, L.T. Glickman, M.H. Goldschmidt, e L.J. McKee. Body conformation, diet and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Amer. J. Epidemiol.*, 133(7):694–702, 1991.
- [153] K. Sorenmo. Canine mammary gland tumors. *Vet. Clin. Small Anim.*, 33:573–596, 2003.
- [154] K.S. Spencer, D. Graus-Porta, J. Leng, N.E. Hynes, e R.L. Klemke. ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinase. *J. Cell Biol.*, 148:385–397, 2000.
- [155] N. Spieker, M. Mareel, E.A. Bruyneel, e H. Nederbragt. E-cadherin expression and in vitro invasion of canine mammary tumor cell. *Eur. J. Cell Biol.*, 68:427–436, 1995.
- [156] C. Stockhaus, B. Kohn, R. Rudolph, e et al. Correlation of hemostatic abnormalities with tumor stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. *J. Small Anim. Pract.*, 40(7):326–331, 1999.
- [157] M. Stovring, L. Moe, e E. Glattre. A population based case-control study of canine mammary tumors and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *APMIS*, 105(8):590–596, 1997.
- [158] Z. Sun, J. Hsiao, D.S. Fay, e D.F. Stern. Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science*, 281:272–274, 1998.
- [159] M. Takagi, Y. Matsuoka, e T. Kurihara nad Y. Yoneda. Chmadrin: a novel Ki-67 antigen-related perichromosomal protein possivly implicated in higher order chromatin structure. *J. Cell. Sci.*, 112:2463–2472, 1999.

- [160] S. Tateyama e E. Cotchin. Alkaline phosphatase reaction of canine mammary mixed tumours: a light and electronmicroscopic study. *Research in Veterinary Science*, 23(3):356–364, 1977.
- [161] G.N. Taylor, L. Shabestari, J. Williams, C.W. Mays, W. Angus, e S. McFarland. Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Res.*, 36:2740–2743, 1976.
- [162] L.H. Tsai, E. Harlow, e M. Meyerson. Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature*, 346:760–763, 1991.
- [163] E. Tzahar, R. Pinkas-Kramarski, J.D. Moyer, L.N. Klapper, I. Alroy, G. Levkowitz, M. Shelly, S. Henis, M. Eisenstein, B.J. Ratzkin, M. Sela, G.C. Andrews, e Y. Yarden. Bivalence of EGF-like ligands drive the ErbB signaling network. *EMBO J.*, 16:4938–4950, 1997.
- [164] A. Urriticoechea, I.E. Smith, e M. Dowset. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23:7212–7220, 2005.
- [165] A.J.P. Van der Burg, B. and Van Selm-Miltenburg, M. Van Maurik, G.R. Rutteman, W. Misdorp, e E.J.J. De Laat, S. and Van Zoelen. Isolation of autonomously growing dog mammary tumors cell line cultured in medium supplemented with serum treated to inactivare growth factors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81(20):1545–1551, 1989.
- [166] E. Van Garderen, M. De Wit, W.F. Voorhout, G.R. Rutteman, J.A. Mol, H. Nederbragt, e W. Misdorp. Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. *Amer. J. Pathol.*, 150(3):1037–1047, 1997.
- [167] F. Van Leeuwen. Epidemiologic aspects of exogenous progestagens in relation to their role in pathogenesis of human breast cancer. *Acta Endocr (Copenhagen)*, 125:13–26, 1991.
- [168] L.J. van't Veer, H. Dai, M.J. van de Vijver, Y.D. He, A.A. Hart, M. Mao, H.L. Peterse, K. van der Kooy, M.J. Marton, A.T. Witteveen, G.J. Schreiber, R.M. Kerkhoven, C. Roberts, P.S. Linsley, R. Bernards, e S.H. Friend. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415:530–536, 2002.
- [169] D. Vassilacopoulou e E.S. Boylan. Mammary gland morphology and responsiveness to regulatory molecules following prenatal exposure to diethylstilbestrol. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 13:59–74, 1993.
- [170] B. Vennstrom e J.M. Bishop. Isolation and characterization of chicken dna homologous to the two putative ongenes of avian erythroblastosis virus. *Cell*, 28:135–143, 1982.

- [171] J.H. Vos, T.S.G.A.M. Van den Ingh, W. Misdorp, R.F. Molenbeek, F.N. Van Mil, G.R. Rutteman, D. Ivanyi, e F.C.S. Ramaeckers. Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin and alpha smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary glands: normal mammary tissue. *Vet. Quartely*, 15(4):179, 1993.
- [172] S. Wakui, T. Muto, e K. Yokoo. Prognostic status of p53 mutations in canine mammary carcinoma. *Anticancer Research*, 21(1B):611–616, 2001.
- [173] J.H. Walter e S. Kling. Biochemical and immunohistochemical characterization of cytokeratins in normal and neoplastic canine mammary glands. *Eur. J. Vet. Pathol.*, 1(3):105–111, 1995.
- [174] M.R. Warner. Age incidence and site distribution of mammary displasia in young beagle bitches. *J. Natl. Cancer Inst.*, 57:57–61, 1976.
- [175] M.R. Warner. Response of beagle displasia to various hormon supplements in vitro. *Cancer Res.*, 37:2062–2067, 1977.
- [176] R.R. White, W.E. Stanley, J.L. Johnson, e et al. Long-term survival in 2505 patients with melanoma with regional lymph node metastasis. *Ann. Surg.*, 235(6):879–887, 2002.
- [177] J.F. Wiesen, P. Young, Z. Werb, e G.R. Cunha. Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development*, 126:335–344, 1999.
- [178] D.P. Winchester, R.T. Osteen, e H.R. Manck. The National Cancer Data Base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age. *Cancer*, 78:1838–1843, 1996.
- [179] S.J. Withrow e E.G. Mac Ewen. *Small Animal Clinical Oncology*. Saunders, Philadelphia, 2001.
- [180] F.M. Yakes, W. Chinratanalab, C.A. Ritter, W. King, S. Seelig, e C.L. Arteaga. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinases and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res.*, 62:4132–4141, 2002.
- [181] T. Yamagami, T. Kobayashi, e K. Takahashi. Prognostis for canine malignant mammary tumors based on the TNM and histologic classification. *J. Vet. Med. Sci.*, 58(7):1079–1083, 1996.
- [182] T. Yamamoto, S. Ikawa, T. Akiyama, K. Semba, N. Nomura, N. Miyajima, T. Saito, e K. Toyoshima. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to the epidermal growth factor receptor. *Nature*, 319:230–234, 1986.
- [183] T. Yamauchi, N. Yamauchi, K. Ueki, T. Sugiyama, H. Waki, H. Miki, K. Tobe, S. Matsuda, T. Tsushima, T. Yamamoto, T. Fujita, Y. Taketani,

- M. Fukayama, S. Kimura, Y. Yazaki, R. Nagai, e T. Kodowaki. Constitutive tyrosine phosphorylation of ErbB-2 via jak2 by autocrine secretion of prolactine in human breast cancer. *J. Biol. Chem.*, 275:33937–33944, 2000.
- [184] Q. Yang, I. Mori, e T. Sakurai et al. Correlation between nuclear grade and biological prognostic variables in invasive breast cancer. *Breast Cancer*, 8:105–110, 2001.
- [185] Y. Yarden. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*, 61(2):1–13, 2001.
- [186] W. Zumkeller. IGFs and IGFBPs: surrogate markers for diagnosis and surveillance of tumor growth? *Mol. Pathol.*, 54(5):285–288, 2001.

Ringraziamenti

A conclusione della mia tesi di laurea vorrei dedicare alcune righe per ringraziare tutte le persone che in un modo o nell'altro hanno contribuito al raggiungimento di questo traguardo. Un elenco non sarebbe esaustivo e non renderebbe merito alle persone citate, inoltre sicuramente mi sarei dimenticato di qualcuno di importante.

In primis devo ringraziare la dr.ssa Valentina Zappulli, mia relatrice, per l'aiuto, la disponibilità, il tempo e, soprattutto, la pazienza con cui mi ha seguito in questi mesi di lavoro nonostante gli impegni accademici e non. Inoltre, la mia gratitudine va alla dr.ssa Laura Cavicchioli, il dr. Sandro Mazzariol, il dr. Diego Calieri, la dr.ssa Gabrita De Zan, la dr.ssa Silvia Ferro, la dr.ssa Giorgia Mezzalana, il prof. M.H. Goldschmidt e il prof. Massimo Castagnaro (mi scuseranno se ho sbagliato i titoli di merito) per il supporto e la stima che mi hanno sempre dimostrato. Non posso dimenticare inoltre il personale tecnico del laboratorio di istopatologia Davide, Henry, Marika e l'onnipresente Riccardo i quali hanno reso più gradevoli le innumerevoli ore passate a fare "l'immuno" ed Emma, Caterina e Roberta compagne di sventura.

La mia riconoscenza va a tutto il corpo docente che mi ha accompagnato durante questi anni di università e in particolare all'autore della mia unica bocciatura.

Questo periodo mi ha permesso di incontrare e conoscere molte persone con le quali ho condiviso gioie e dolori della vita da studente universitario e che approfitto per ringraziare: Rizzi, Enrico, Socal, Zomer, Nicolò, Franz, Alessandro (Parlantina), Marco, Stefano, Fabio, Alberto, Davide, Mary, Valeriana, Toni, Ciffo, Bucci, Massimo, Luca, Vanessa, Tamara, Sara, la signora Pia e la signora Anna. E sicuramente ho dimenticato qualcuno. . .

Un pensiero particolare va al prof. Novak e alla prof.ssa Tomasella, i quali mi hanno accompagnato durante le superiori: da loro ho appreso molto, sia in ambito scolastico che dal lato umano. Dei miei compagni ricordo Emiliano e Marta. Colgo l'occasione per esprimere la mia gratitudine alla dr.ssa Roberta Marcon e al dr. Filippo Menegale per la pazienza portata durante il mio tirocinio, per le tante cose che mi hanno insegnato e per la loro stima.

La mia gratitudine va alla mia famiglia per avermi sostenuto durante il mio corso di studi e per avermi dato una mano quando ne avevo bisogno. So di poter sempre contare su di voi e sul vostro affetto.

Infine, un ringraziamento particolare ad Alice che mi sta accanto e mi sopporta da quasi sette anni e che durante questo periodo mi ha sempre spronato

ad andare avanti e a dare sempre il meglio anche quando le circostanze non erano favorevoli. Non sarei arrivato fin qui senza di te.

E ora...

Fletto i muscoli e sono nel vuoto...

Matteo