



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

**Profilo di metilazione ed angiogenesi nel melanoma
orale canino: studio immunoistochimico di
5-metilcitosina (5-mC) e recettore di tipo B
dell'endotelina (ETBR)**

Relatore

Prof. Massimo Castagnaro

Correlatrice

Dott.ssa Marta Giacomazzo

Laureanda

Nicole Arduini

Matricola

n. 1205573

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

SOMMARIO

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUZIONE	4
1.1 DEFINIZIONI	4
1.2 MELANOCITI	7
1.3 FATTORI DI RISCHIO.....	7
2 PATOGENESI	9
2.1 ALTERAZIONI GENETICHE	9
2.1.1 MUTAZIONI GENICHE	9
2.1.2 ALTERAZIONI CROMOSOMICHE.....	10
2.2 COMPORTAMENTO BIOLOGICO	11
2.2.1 METASTASI.....	11
3 PRESENTAZIONE CLINICA	13
3.1 SEGNI CLINICI	13
3.2 DIAGNOSI DIFFERENZIALI.....	14
4 DIAGNOSI	17
4.1 CITOLOGIA.....	17
4.1.1 VALUTAZIONE CITOLOGICA DEI LINFONODI	17
4.2 ISTOLOGIA	18
4.2.1 PATTERN ISTOLOGICI	19
4.3 IMMUNOISTOCHEMICA	21
4.4 ISTOCHEMICA	22
4.4.1 COLORAZIONE DI FONTANA-MASSON	22
4.4.2 COLORAZIONE DI SCHMORL	23
4.4.3 COLORAZIONE DI WARTHIN-STARRY	24
5 TERAPIA	26
5.1 TRATTAMENTO CHIRURGICO.....	26

5.2 CHEMIOTERAPIA.....	27
5.3 IMMUNOTERAPIA	28
5.4 RADIOTERAPIA.....	29
6 PROGNOSI.....	30
6.1 ETÀ.....	30
6.2 LOCALIZZAZIONE.....	30
6.3 STADIO.....	30
6.4 DIMENSIONI.....	31
6.5 LISI OSSEA.....	31
6.6 MARKERS ISTOLOGICI.....	31
6.7 MARKERS IMMUNOISTOCHIMICI	33
7 ANGIOGENESI	35
7.1 PROCESSO DI ANGIOGENESI	35
7.2 ANGIOGENESI TUMORALE	36
7.3 VALUTAZIONE DELL' ANGIOGENESI NEL MELANOMA.....	38
7.3.1 ENDOTELINE.....	38
7.3.2 RECETTORE DELL'ENDOTELINA DI TIPO B NEL MELANOMA.....	38
8 METILAZIONE	40
8.1 EPIGENETICA	40
8.1.1 MODIFICAZIONI DEGLI ISTONI.....	40
8.1.2 microRNA (miRNA).....	41
8.1.3 METILAZIONE DEL DNA.....	41
9 OBIETTIVO DELLA TESI	44
10 MATERIALI E METODI.....	45
10.1 CAMPIONI DI MELANOMA ORALE CANINO.....	45
10.2 IMMUNOISTOCHIMICA	45
10.3 SCORE IMMUNOISTOCHIMICO	47
10.4 ANALISI STATISTICA.....	48
11 RISULTATI.....	49

12 DISCUSSIONE	54
13 CONCLUSIONI	58
BIBLIOGRAFIA	59

RIASSUNTO

Il melanoma orale canino (MOC), un tumore che origina dai melanociti, è la neoplasia orale più comune nel cane. Colpisce generalmente i soggetti anziani in diverse sedi anatomiche, prevalentemente a livello gengivale. Dimostra un comportamento molto aggressivo, infatti, l'incidenza di metastasi risulta elevata con un tempo di sopravvivenza medio di 2 mesi. La diagnosi definitiva si ottiene tramite tecnica immunoistochimica che consente, inoltre, la valutazione di uno tra i fattori prognostici, riportati in letteratura, ovvero l'indice Ki67.

La valutazione prognostica attualmente disponibile si basa su una combinazione di: indice Ki67, atipia nucleare, conta mitotica e invasione ossea: tuttavia, i risultati ottenuti con questa combinazione non sono in grado di descrivere il comportamento biologico del MOC.

È riconosciuto che l'angiogenesi svolga un ruolo fondamentale per la crescita tumorale e per lo sviluppo di metastasi. Attualmente, anche le alterazioni epigenetiche, ossia le modificazioni di geni non strutturali, sono considerate come meccanismi patogenetici significativi alla base della progressione neoplastica; tra questi la metilazione del DNA sembra essere tra quelli maggiormente rilevanti nello sviluppo del MOC.

L'obiettivo di questo studio è quello di ampliare ed integrare una precedente ricerca volta a valutare il ruolo dell'angiogenesi e della metilazione del DNA come possibili fattori prognostici, indagando l'espressione immunoistochimica, rispettivamente, del recettore per l'endotelina di tipo B (ETBR) e di 5-metilcitosina (5-mC).

Per ogni campione è stata quantificata la percentuale di cellule neoplastiche immunoreattive. Successivamente tale percentuale è stata confrontata con il corrispettivo tempo medio di sopravvivenza (TSM), considerato come indice di aggressività tumorale, tramite analisi statistica.

Dai risultati dello studio si conferma, come già precedentemente evidenziato, che ETBR e 5-mC sono entrambi espressi dal MOC. Tuttavia, non si è dimostrata una correlazione statisticamente significativa tra questi due fattori prognostici e l'aggressività del tumore.

Tali dati dovranno essere ulteriormente confermati, ampliando la casistica a disposizione.

ABSTRACT

Canine oral melanoma (COM), a tumor arising from melanocytes, is the most common neoplasia in dogs. Older dogs are frequently affected at different anatomical sites, predominantly at the gingival level. It shows aggressive biological behavior, in fact the incidence of metastasis is high with a mean survival time of 2 months.

The definitive diagnosis is obtained by immunohistochemistry, a technique that allows, in addition, the evaluation of Ki67 index, a prognostic factor reported in the literature. Currently, the prognostic evaluation is a combination based on: Ki67 index, mitotic count, and bone invasion. However, the results obtained by this combination are not able to completely identify the biological behavior of COM.

Angiogenesis plays a fundamental role in tumor growth and in the development of metastasis.

Analogously, also epigenetic mechanisms, non-structural modification of gene expression, are considered significant pathogenetic mechanisms involved in neoplastic progression; among these, DNA methylation appears to be one of the most relevant mechanisms involved in the tumor's development.

The goal of this study is to complement previous research aimed to evaluate the role of angiogenesis and DNA methylation as possible prognostic factors, through the investigation of the immunohistochemistry expression of endothelin type B receptor (ETBR) and 5-methylcytosine (5-mC), respectively.

For each sample, the percentage of immunoreactive neoplastic cells was quantified. This percentage was compared with the corresponding mean Survival Time (MST) by statistical analysis, considering the MST an index of tumor aggressiveness. Our results showed, as previous evidenced, that ETBR and 5-mC are both expressed by COM.

However, there was no statistically significant correlation between these two prognostic factors and the aggressivity of the tumor.

Further studies to expand the number of cases will be needed to confirm our results.

1 INTRODUZIONE

1.1 DEFINIZIONI

Il melanoma orale canino (MOC) è la più comune neoplasia maligna che interessa il cavo orale del cane (Bergman, 2007).

La sua insorgenza è dovuta a una proliferazione anomala dei melanociti, cellule che risiedono nello strato basale dell'epidermide, contenenti i granuli di melanina. Esso manifesta un'elevata tendenza a metastatizzare e ad invadere l'osso sottostante (Bergman et al., 2012).

Il MOC rappresenta circa il 7% di tutti i tumori maligni nei cani, con più di 160 mila casi riportati ogni anno a livello mondiale (Segaoula et al., 2018).



8 cases/1 000 000 (3-7% canine Tumors)
Age: variable
Predispositions: Scottish terriers, golden retrievers, poodles, and dachshunds
Localization site: oral
Pathological diagnosis: Melan A, S100
Genomic Status: TP53, GNAQ, NRAS, PTEN, c-Kit
Treatment: Surgery, Radio-, Immuno- and Chemotherapy
Survival rate: 4-12 months

Fig. 1 Illustrazione riassuntiva del melanoma orale canino (Segaoula et al., 2018).

Il MOC può essere distinto in forma melanotica o amelanotica, a seconda della capacità dei melanociti neoplastici di produrre la melanina (Scattone et al., 2021).

Interessa indistintamente entrambi i sessi con una maggiore casistica in alcune razze (figura 2), tra cui: Scottish Terrier, Golden Retriever, Labrador Retriever, Barbone e Bassotto; senza, però, fattori di rischio predisponenti. In particolare, uno studio epidemiologico effettuato su 2350 cani affetti da melanoma orale ha evidenziato che la razza Barbone appare

ad alto rischio di MOC (Scattone et al., 2021). Inoltre, sembra che anche le razze di cani con la mucosa orale fortemente pigmentata, siano maggiormente colpite da tale neoplasia, come ad esempio i Chow Chow (Bergman et al., 2012).

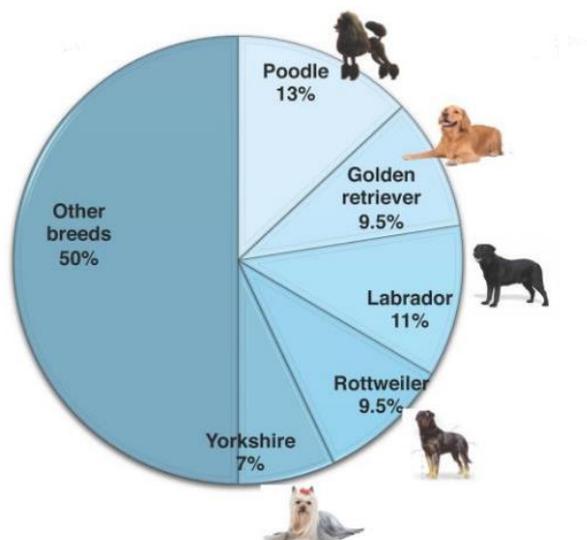


Fig. 2 Distribuzione delle razze di cane colpite in uno studio di 247 melanomi orali (Prouteau & André, 2019).

Le sedi in cui il MOC si riscontra maggiormente sono in ordine di frequenza, gengiva, labbra, lingua e palato duro. L'età d'insorgenza media è attorno agli 11 anni (Murphy et al., 2019). Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), la stadiazione del melanoma orale canino è basata sulle dimensioni, sull'interessamento dei linfonodi regionali e sull'eventuale presenza di metastasi (Owen, 1980), ovvero così riassunto:

- stadio I= < 2 cm di diametro
- stadio II= 2-4 cm di diametro
- stadio III= ≥ 4 cm e/o metastasi ai linfonodi
- stadio IV = metastasi distanti

Il tempo medio di sopravvivenza, variabile a seconda delle caratteristiche del tumore e dello stadio, è di meno di 36 mesi (Nishiya et al., 2016). Se sono presenti metastasi polmonari o se non viene eseguito alcun trattamento, il tempo medio di sopravvivenza si accorcia a 65 giorni (Bergman et al., 2012; Pazzi et al., 2022).

I melanomi canini, oltre al cavo orale, possono colpire anche altre sedi, quali cute, letto ungueale, occhio, sistema gastro-enterico, sistema nervoso centrale e giunzione muco-cutanea (figura 3). In ogni caso, il melanoma orale rimane la neoplasia con una prognosi peggiore (Prouteau & André, 2019).

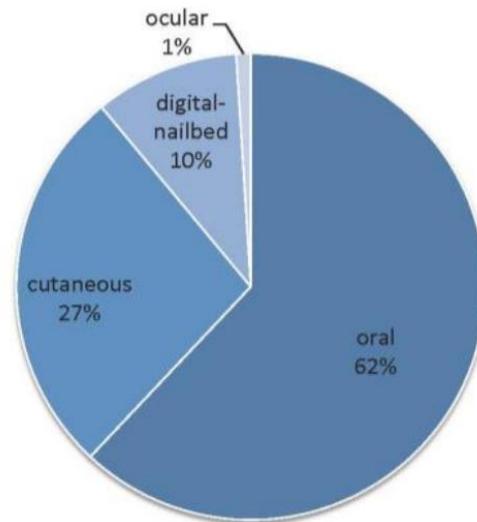


Fig. 3 Distribuzione del melanoma maligno canino in base alla localizzazione (Prouteau & André, 2019).

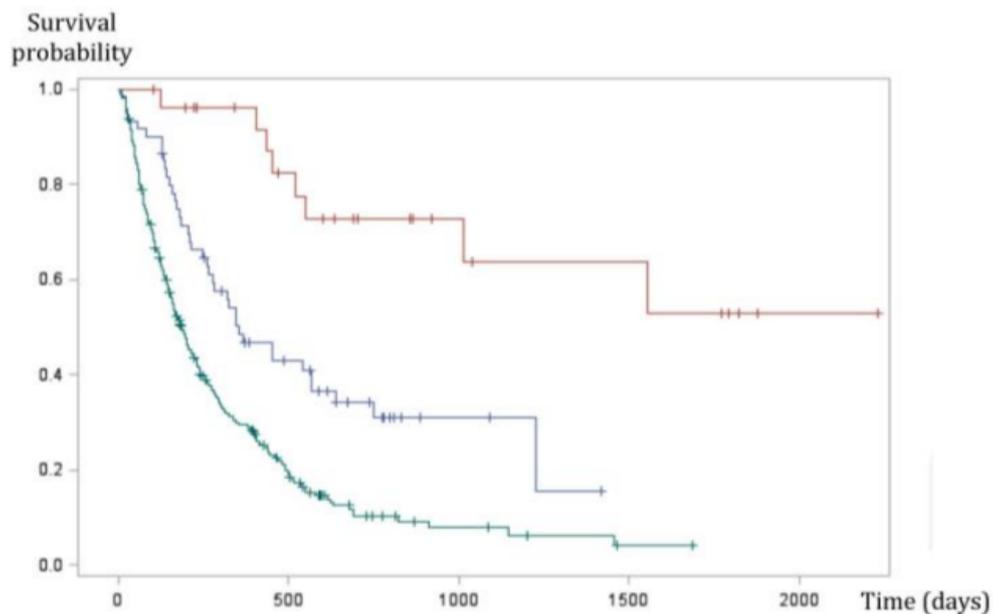


Fig. 4 Curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier di 335 cani con melanoma maligno orale (linea verde), digitale (linea blu) e cutaneo (linea rossa) (Prouteau & André, 2019).

1.2 MELANOCITI

I melanociti sono cellule che derivano dall'ectoderma, nello specifico dalle cellule della cresta neurale, le quali danno origine anche ai neuroni sensoriali e alle cellule della glia.

I melanociti si localizzano generalmente nello strato basale dell'epidermide, ma si possono trovare anche nella coroide, nella tonaca vascolare e nello stroma connettivale dell'iride (Alberto Camacho Vargas, 2017).

La melanina possiede molteplici funzioni biologiche, tra cui la pigmentazione cutanea e del manto, oltre alla fotoprotezione di cute ed occhi. Un ulteriore ruolo della melanina è fornire protezione contro i danni prodotti dalle sostanze ossidanti e dalla lisi enzimatica. Inoltre, protegge da stress termico e chimico ed ha proprietà immunomodulatrici (nella risposta immunitaria innata di insetti, uccelli e mammiferi). Infine, la melanina produce un ampio spettro di colori attraverso i suoi indici di rifrazione e potrebbe beneficiare nel camouflage e nella selezione sessuale (Lai & Healy, 2016).

1.3 FATTORI DI RISCHIO

Non sono stati dimostrati fattori di rischio predisponenti all'insorgenza del MOC. Tuttavia, pare che alcuni fattori quali, consanguineità, traumi, esposizioni chimiche, ormoni e suscettibilità genetica possano indurre a tale predisposizione. Sebbene il ruolo della mutagenesi indotta dall'esposizione solare sia riconosciuto come rilevante nello sviluppo della neoplasia nell'uomo, nel cane è dubbio e poco probabile, considerando che il mantello protegge dai raggi UV e che le mucose non sono normalmente esposte al sole (Nishiya et al., 2016; Bergman et al., 2012).

Il maggior riscontro del MOC in razze pure, fa pensare, inoltre, che possano esserci predisposizioni ad alterazioni genetiche ed epigenetiche a carico dei geni e delle proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare (Nishiya et al., 2016).

Uno studio del 2022 ha analizzato il ruolo del microbioma orale di 15 cani affetti da MOC, evidenziando come la presenza di batteri quali *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* possa rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo del MOC, già precedentemente dimostrato per i tumori gastroenterici nell'uomo.

Infatti, rispetto al gruppo di controllo, questi batteri risultavano significativamente aumentati. Il loro incremento potrebbe derivare da una parodontite su base infiammatoria, grave e cronica, precedente la neoplasia o secondaria ad essa, oppure su base infettiva, generalmente purulenta e secondaria alla neoplasia (Pires De Carvalho et al., 2022).

2 PATOGENESI

La caratteristica biologica determinante del melanoma è la sua capacità di produrre la melanina. La distruzione dell'omeostasi che si instaura tra la stretta associazione tra melanociti e cheratinociti potrebbe condurre allo sviluppo del melanoma. Una volta che le cellule tumorali evadono il controllo dei cheratinociti, possono invadere il tessuto sottostante attraverso la degradazione della matrice extracellulare, mediante l'azione delle metallo-proteinasi (Nishiya et al., 2016).

2.1 ALTERAZIONI GENETICHE

2.1.1 MUTAZIONI GENICHE

In medicina umana, le mutazioni maggiormente coinvolte nella genesi del cancro sono a carico del gene TP53. Questo aspetto è stato osservato anche nel MOC, dove nell'8-13% dei casi sono state riscontrate mutazioni del gene *TP53*.

TP53 è un gene oncosoppressore che codifica per la proteina *p53*, che a sua volta regola il ciclo cellulare, la riparazione del DNA, l'invecchiamento cellulare e l'apoptosi. La perdita di funzionalità di questa proteina determina l'amplificazione del protooncogene *MDM2*, capace di inattivare *p53*. Quindi, si pensa che lo sviluppo tumorale sia innescato dalla perdita dell'azione protettiva di *p53*, in seguito a mutazioni o al silenziamento del suo gene *TP53*, e alla conseguente amplificazione di *MDM2* (Palma et al., 2021).

Inoltre, anche mutazioni al protooncogene *NRAS*, riportate nel 3.9% di MOC (Bowlit Blacklock et al., 2019), sembrano essere coinvolte nella patogenesi del melanoma, in quanto comportano l'attivazione delle proteine *NRAS*, attivatrici delle GTPasi e di chinasi con attività mitogena. Infine, mutazioni nonsense e frameshift del gene *PTEN*, che codifica per la proteina *PTEN* regolando il ciclo cellulare, causano la proliferazione incontrollata delle cellule neoplastiche (Palma et al., 2021).

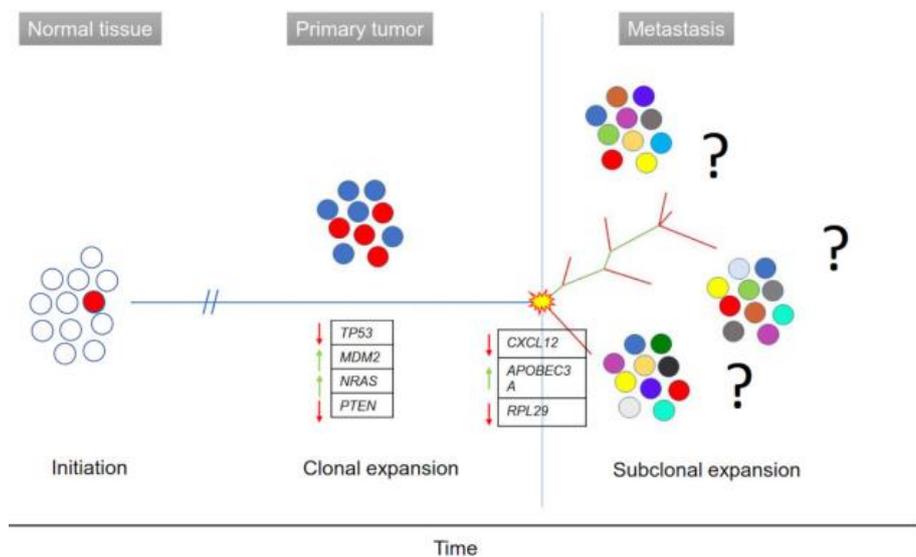


Fig. 5 Modello ipotetico di MOC, dall'iniziazione alle metastasi (Palma et al., 2021).

2.1.2 ALTERAZIONI CROMOSOMICHE

Le modificazioni cromosomali di numero e struttura possono condurre ad alterazioni geniche coinvolte nella patogenesi del MOC.

È stato dimostrato che circa nel 70% dei melanomi mucosali maligni ci sono mutazioni o delezioni nel locus *CDKN2A*, del cromosoma 9p21 (Nishiya et al., 2016). I melanomi orali canini sono spesso associati ad una trisomia dei cromosomi (CFA) 13, 17, 20, 29 e 36; mentre presentano una monosomia di CFA2, 22 e 27. In aggiunta, è stato osservato da uno studio condotto da Brocca et al. (2019) come il melanoma mucosale umano e il MOC condividano cambi cromosomali in 32 regioni.

Queste alterazioni sono associate a perdite focali a carico del CFA10 e acquisizione focale di materiale genetico nel cromosoma CFA30. Inoltre, l'amplificazione focale di CFA30 è associata significativamente a tumori con elevato indice mitotico, fenotipo amelanotico e ridotto tempo di sopravvivenza; quindi, il profilo di CFA30 potrebbe contribuire direttamente al comportamento aggressivo del tumore (Hardwick, 2021; Prouteau et al., 2020).

La combinazione delle alterazioni geniche e cromosomiche porta alla trasformazione neoplastica delle cellule e alla loro evasione dai segnali inibitori. Normalmente la crescita

cellulare è regolata da delle vie di attivazione, che nei tumori risultano alterate, fattore determinante per il loro sviluppo e la loro sopravvivenza. In particolare, nel MOC si osservano delle modificazioni a carico della via della MAPK e della PI3K (Brocca et al., 2019).

Queste due vie svolgono un ruolo centrale nella proliferazione, nel differenziamento, nello sviluppo, nella migrazione, nell'apoptosi e nella trasformazione delle cellule tumorali nel MOC (Hardwick, 2021).

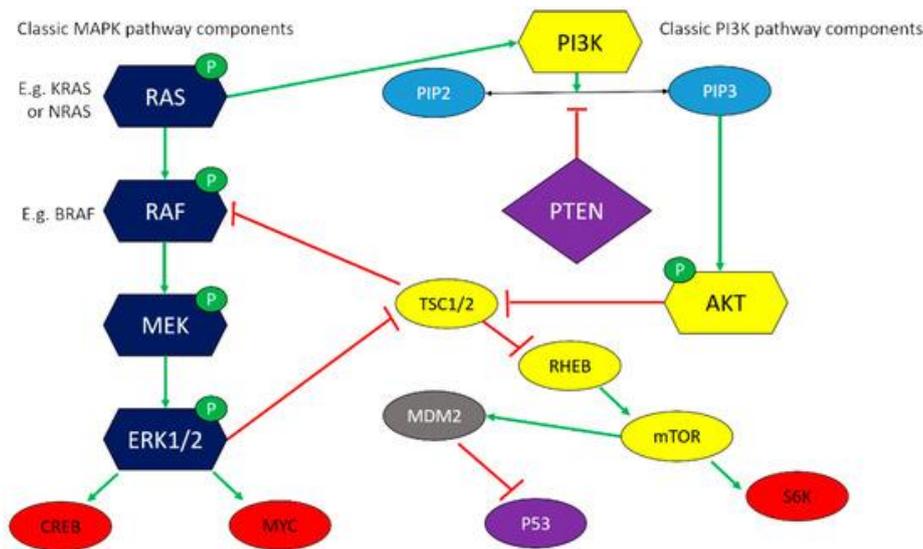


Fig. 6 Via della MAPK e della PI3K. Le frecce verdi indicano gli effetti attivatori mentre le barre rosse indicano gli effetti inibitori. Le forme rosse illustrano i fattori di trascrizione chiave nella proliferazione, nella crescita e nella sopravvivenza cellulare; invece le forme viola evidenziano le proteine coinvolte nella soppressione tumorale (Hardwick, 2021).

2.2 COMPORTAMENTO BIOLOGICO

2.2.1 METASTASI

Il melanoma orale è una neoplasia estremamente aggressiva, caratterizzata da rapida crescita e metastasi linfonodali (66%), polmonari (53%), ossee (36%), epatiche e cerebrali (20%) (Bowl Blacklock et al., 2019). Le metastasi rappresentano la causa di morte più comune, e ad oggi, non esiste una terapia in grado di trattarle o di prevenirle.

Le metastasi polmonari possono essere identificate tramite l'uso della radiografia toracica, con almeno 2 proiezioni, o della tomografia computerizzata. Per le metastasi al fegato si può ricorrere all'ecografia addominale, anche se non è eseguita di routine (Meyer B. & Martin O., 2021).

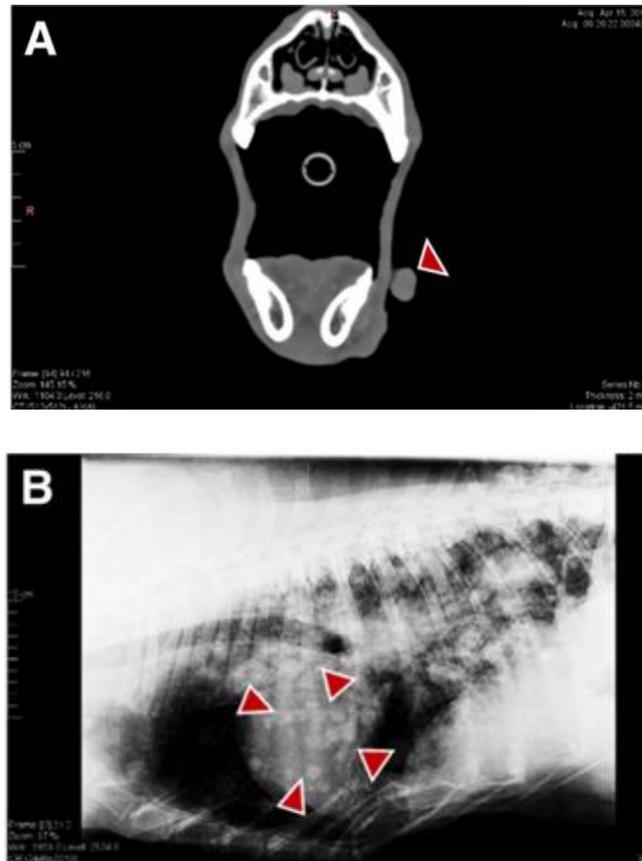


Fig. 7 A TAC di un cane con tumore nella cavità orale. B RX in proiezione laterale dello stesso cane con metastasi distanti a livello toracico (Segaoula et al., 2018).

3 PRESENTAZIONE CLINICA

3.1 SEGNI CLINICI

Il proprietario potrebbe notare la presenza del tumore nella cavità orale del cane, che può apparire come una massa nera (melanotica) o rosea (amelanotica), anche se in alcuni casi non provoca segni clinici e passa inosservato, specialmente se situato nella porzioni più caudali della cavità orale (Alberto Camacho Vargas, 2017).

L'animale può mostrare alitosi, difficoltà ad alimentarsi e bere, scialorrea, difficoltà alla masticazione con eventuale perdita dei denti, lingua pendula da un lato. In aggiunta, può manifestare gonfiore facciale, sanguinamento e frattura della mandibola (Kim et al., 2021).



Fig. 8 Cane, melanoma orale melanotico che emerge dalla mucosa mascellare (Meyer B. & Martin O., 2021).



Fig. 9 Cane, melanoma orale amelanotico localizzato sul palato e sulla mascella tra PM3 e PM4 (Murphy et al., 2019).

3.2 DIAGNOSI DIFFERENZIALI

Le possibili diagnosi differenziali, dal punto di vista macroscopico, per il MOC sono:

- Fibrosarcoma o sarcomi dei tessuti molli: indica un gruppo eterogeneo di tumori che originano dal tessuto mesenchimale dei tessuti molli (muscolare, fascia, adiposo, fibroso, guaina mielinica, parete perivascolare) e più frequentemente emergono dalla cute o dal sottocute (Linden et al., 2019). A livello microscopico si osservano fasci e vortici di cellule fusate fortemente indifferenziate e con elevato indice mitotico (Poli A, 2004).
- Melanocitoma: è la versione benigna del melanoma, sempre composto da melanociti atipici che si trovano nella regione basale dell'epitelio e si estendono fino alla sub-mucosa (melanocitoma giunzionale) oppure nel connettivo sub-epiteliale (melanocitoma dermico) (Nishiya et al., 2016), ma, nel cavo orale, raramente lo si riscontra nei cani. Generalmente è una massa di diametro <1 cm, ben demarcata e non infiltrante. Dal punto di vista istologico, le cellule sono uniformi, di forma rotondeggiante o allungata, fortemente pigmentate, presentano un nucleo con

cromatina finemente granulare e un unico nucleolo prominente, le mitosi sono rare (Smedley et al., 2022).

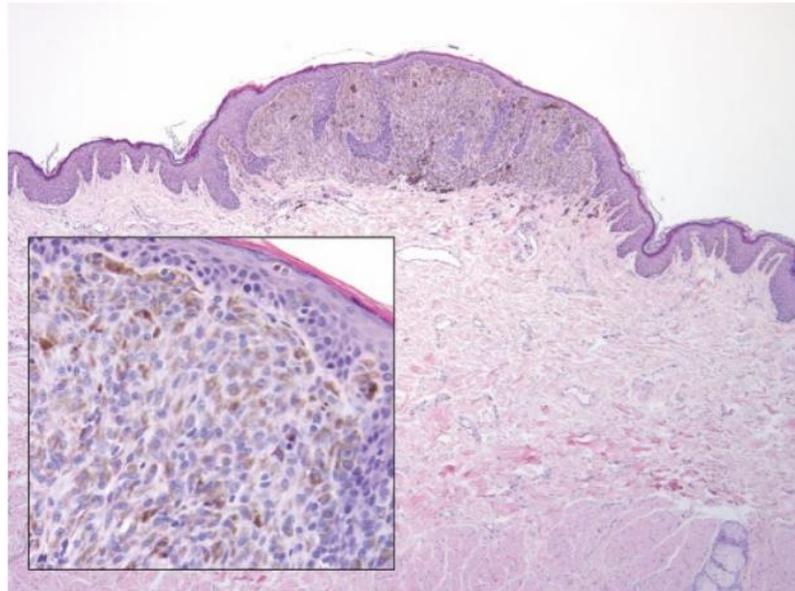


Fig. 10 Cane, istologia di un melanocitoma labiale. Si osserva una piccola massa mucosale sollevata con all'interno melanociti con moderate quantità di melanina. Al contrario di melanociti neoplastici, non si osservano figure mitotiche o atipia nucleare (Murphy et al., 2019).

- Carcinoma squamocellulare: è il secondo tumore orale maligno più frequente nel cane e può essere localizzato anche a livello cutaneo, specialmente digitale e subungueale. È localmente invasivo e può coinvolgere l'osso, ma a differenza del melanoma raramente metastatizza (Grier & Mayer, 2007; Murphy et al., 2019). Nelle forme differenziate si osservano cellule grandi, poliedriche e non cheratinizzate alla periferia mentre al centro si distinguono cellule cheratinizzate, con accumuli di cheratina compatta (perle di cheratina). A mano a mano che il tumore diventa meno differenziato aumentano il numero di mitosi e diminuisce la presenza delle perle di cheratina. Nel caso di carcinoma squamocellulare a cellule fusate, si osserva la presenza di cellule fusate fortemente pleomorfe associate a cellule poligonali (Nemec et al., 2012).
- Mastocitoma: è un tumore originante dai mastociti che si presenta con cellule con granuli citoplasmatici, che raramente può essere localizzato su labbra, gengive, lingua e palato duro; anche se nelle forme scarsamente differenziate i granuli

citoplasmatici sono difficili da reperire e prevalgono i segni di atipia (Mechelli & Lepri, 2004). Come il MOC ha un'elevata tendenza a metastatizzare (Elliott et al., 2016).

- Epulide: indica una lesione di tipo proliferativo che frequentemente colpisce il cane e coinvolge la gengiva. Le lesioni possono essere più o meno pigmentate, possono ulcerarsi e infettarsi (Poli A, 2004). A livello istopatologico si osserva un'iperplasia reattiva senza segni di atipia (Knaake & Verhaert, 2010).

4 DIAGNOSI

4.1 CITOLOGIA

L'esame citologico è uno strumento utile per la diagnosi di MOC. Diversi studi hanno dimostrato una sensibilità e specificità del 100% in caso di diagnosi di melanoma melanotico, mentre una sensibilità (67-100%) e una specificità (85-100%) variabili nelle forme amelanotiche (Freeman, 2007).

4.1.1 VALUTAZIONE CITOLOGICA DEI LINFONODI

Nei casi di MOC, l'aumento delle dimensioni dei linfonodi regionali non è predittivo della presenza o assenza di metastasi. Il ruolo diagnostico della citologia delle metastasi ai linfonodi è spesso ambiguo.

I linfonodi fisiologicamente possono contenere melanociti, melanofagi, granuli di melanina, che possono complicare la diagnosi citologica e istologica (Przeździecki et al., 2015; Grimes et al., 2017).

Uno studio condotto da Przeździecki et al. (2015) ha riscontrato una corretta diagnosi di metastasi linfonodali di MOC amelanotico in 4/6 casi, svolta attraverso la tecnica dell'ago aspirato. Al contrario lo studio di Grimes et al. (2017) ha evidenziato una correlazione da discreta a scarsa tra citologia ed istopatologia. Uno studio di medicina umana ha evidenziato che solo il 27% di metastasi ai linfonodi contengono pigmento (Sharkey et al., 2021), ostacolando ulteriormente la diagnosi attraverso la valutazione dei linfonodi.

Nonostante questo, l'agoaspirato dei linfonodi sentinella è spesso utilizzato, in caso di cellule amelanotiche sospette, ma deve essere confermato attraverso un'indagine immunocitologica (ICC), utilizzando anticorpi anti Melan-A, anti-vimentina e anti-citocheratina (Przeździecki et al., 2015).

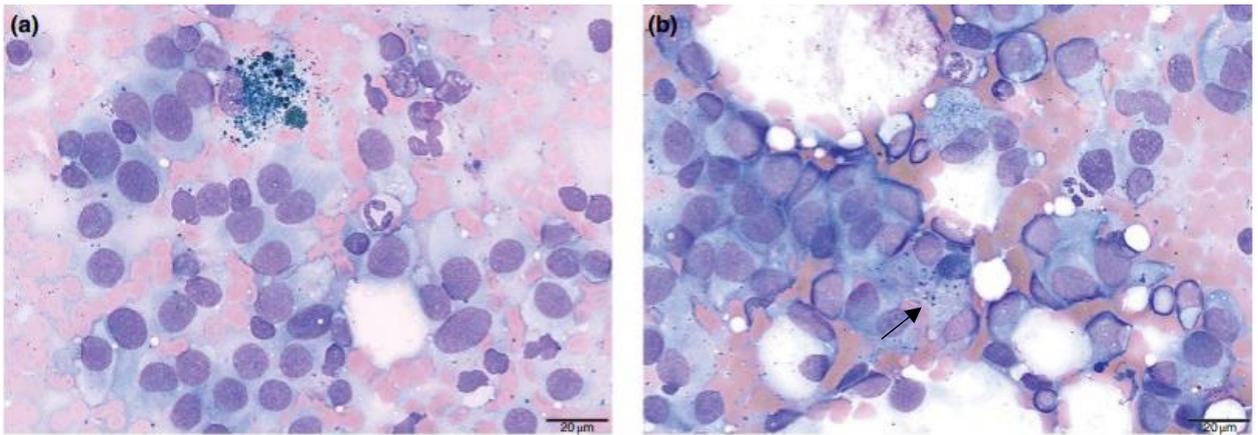


Fig. 11 Cane, massa orale, ago aspirato del linfonodo mandibolare. In **(a)** si osserva una cellula rotondeggiante di grandi dimensioni, con abbondante citoplasma contenente granuli di melanina, che potrebbe essere interpretato come un melanofago. In **(b)** si osservano cellule con scarsi granuli citoplasmatici di colore nero (freccia). L'istologia e l'immunoistochimica con Melan-A hanno poi confermato la diagnosi di melanoma orale scarsamente pigmentato. (Sharkey et al., 2021).

4.2 ISTOLOGIA

Dal punto di vista istologico il melanoma appare molto vario, può derivare dal derma, dalla giunzione dermico-epidermica o dalla mucosa. Si possono osservare nidi di cellule neoplastiche nell'epidermide, per quanto riguarda i tumori che interessano la mucosa o l'epitelio; inoltre è comune riscontrare anche iperplasia epidermica e ulcerazione (Freeman, 2007).

La diagnosi istologica può risultare difficile, specialmente se il tumore non contiene melanina. I melanomi amelanotici possono rappresentare fino a 1/3 di tutti i casi di melanoma canino. Per questa ragione si fa ricorso all'immunoistochimica, che tramite l'utilizzo di markers come Melan-A rende possibile la diagnosi definitiva (Nishiya et al., 2016).

4.2.1 PATTERN ISTOLOGICI

Il melanoma può essere diviso in tre principali pattern a seconda della forma delle cellule: epitelioidi, fusati e misto.

Il pattern epitelioidi è caratterizzato da cellule rotondeggianti e poligonali e rappresenta la forma più comune di melanoma. A livello microscopico si osservano cellule formanti strutture a nido, cellule giganti multinucleate e mitosi atipiche (Nishiya et al., 2016).

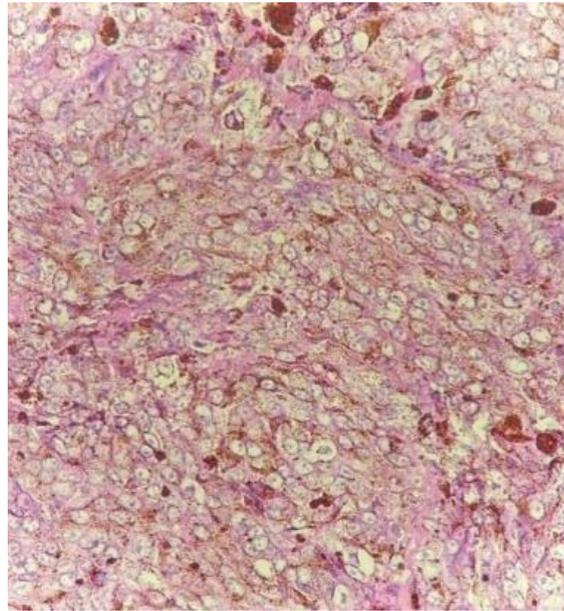


Fig. 12 Cane, melanoma epitelioidi gengivale, H&E (Alberto Camacho Vargas, 2017).

La variante fusata, in cui le cellule tumorali somigliano a fibroblasti, rappresenta il 34% dei casi di MOC secondo Ramos-Vara et al. (2000) e la sua diagnosi istologica si basa sulla presenza di melanina e di attività giunzionale.

Se queste caratteristiche sono assenti è difficile distinguere microscopicamente la variante fusata amelanotica da un sarcoma dei tessuti molli (STS). È importante evidenziare le differenze tra i due, in quanto il STS non ha tendenza a metastatizzare e può essere trattato con chirurgia o radioterapia, a differenza del MOC (Tsoi et al., 2021).

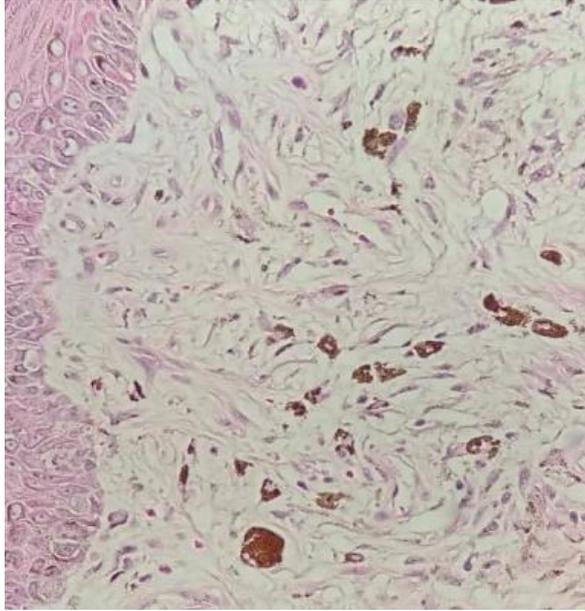


Fig. 13 Cane, melanoma fusiforme cutaneo, H&E (Alberto Camacho Vargas, 2017).

Il pattern misto, invece, è caratterizzato istologicamente da entrambi i tipi cellulari precedentemente descritti.

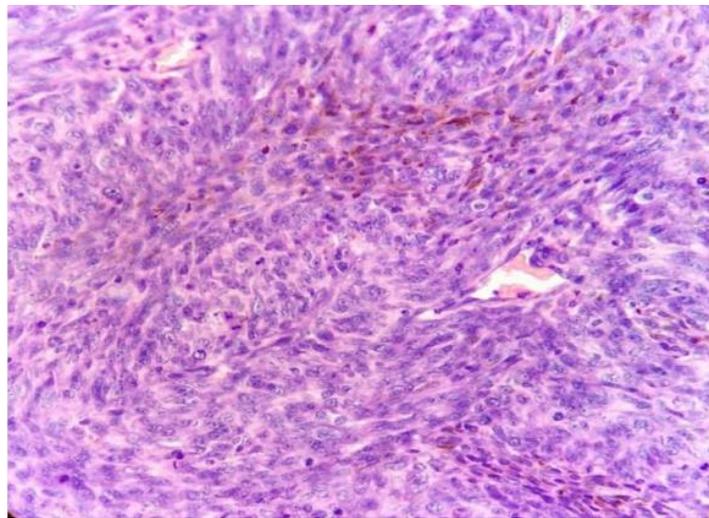


Fig. 14 Cane, melanoma orale misto, H&E (Alberto Camacho Vargas, 2017).

4.3 IMMUNOISTOCIMICA

L'esame immunoistochimico è utilizzato per la conferma diagnostica di neoplasie la cui sola morfologia istologica non ne consente una corretta identificazione. Si basa sull'individuazione di componenti intracitoplasmatici, della membrana cellulare o del nucleo attraverso il legame con anticorpi specifici (markers) e sistemi di rilevazione enzimatica o fluorescenti. Spesso, si ricorre all'uso di anticorpi multipli per identificare il fenotipo e l'istogenesi delle cellule neoplastiche (Magaki et al., 2019).

Il marker immunoistochimico più utilizzato per il MOC è il Melan-A (monoclonal mouse anti-human Melan-A) ma altri markers estremamente validi sono il PNL-2 (melanoma-related antigen), il TRP-1 (tyrosinase-related protein-1) e il TRP-2 (tyrosinase-related protein-2).

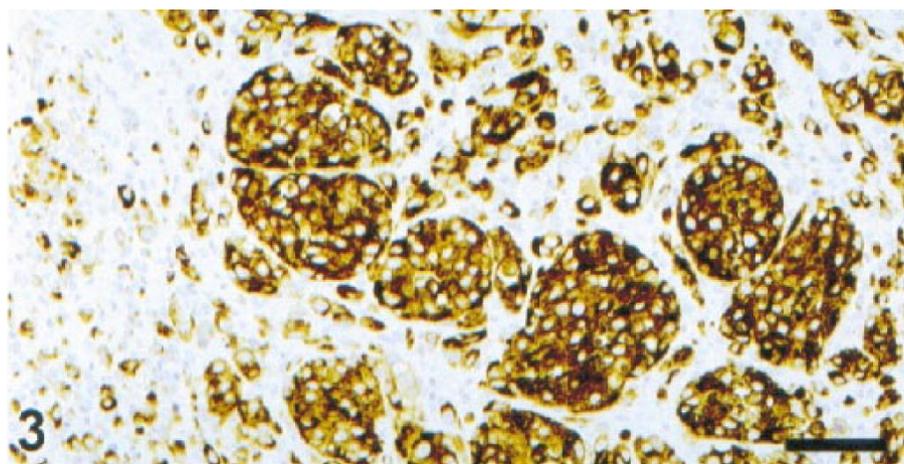


Fig. 15 Cane, melanoma orale labiale positivo al marker immunoistochimico Melan-A (Ramos-Vara et al., 2000).

L'immunoistochimica ha dei limiti specialmente in caso di neoplasie anaplastiche o scarsamente differenziate, in cui si può avere la perdita dell'espressione degli antigeni da legare e pertanto i singoli marker utilizzati potrebbero dare origine a dei falsi negativi, per questo il gold standard in caso di neoplasie amelanotiche è l'utilizzo di un cocktail di anticorpi contro Melan-A, PNL-2, TRP-1 e TRP-2, che hanno una sensibilità del 93,3%, nel differenziamento dai sarcomi dei tessuti molli, e una specificità del 100% (Smedley et al., 2022).

Inoltre, il MOC è risultato positivo alla vimentina (costituente del citoscheletro) e variabilmente positivo alla famiglia di proteine S-100 e alla NSE (neuron-specific enolase) (Smedley et al., 2022).

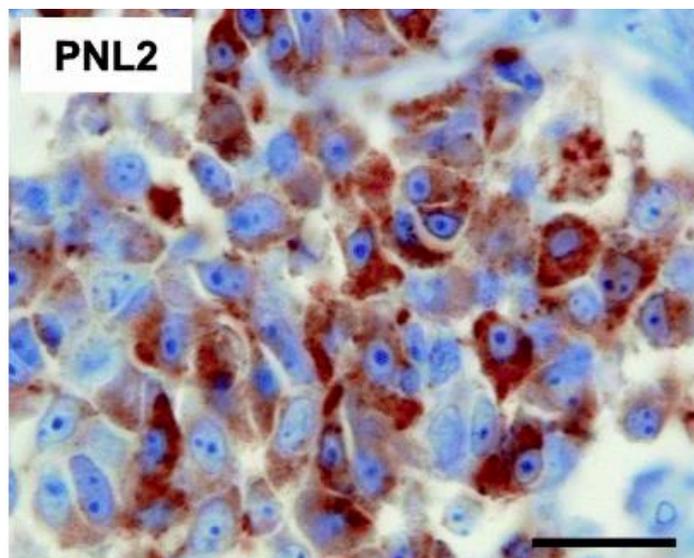


Fig. 16 Cane, melanoma orale gengivale positivo al marker immunoistochimico PNL-2 (Tani et al., 2021).

4.4 ISTOCHIMICA

In alternativa, la melanina può essere differenziata da altri pigmenti e identificata con le colorazioni di Fontana-Masson, Schmorl o Warthin-Starry.

Spesso è necessaria la rimozione dell'eccesso di melanina dai melanomi fissati in paraffina per ottenere una valutazione istomorfologica e una miglior valutazione dei nuclei (Nishiya et al., 2016).

4.4.1 COLORAZIONE DI FONTANA-MASSON

La colorazione istochimica di Fontana-Masson si basa sull'utilizzo di una soluzione di nitrato d'argento ed è utilizzata per la visualizzazione istologica della melanina e di granuli argentaffini, specialmente in caso di neoplasie scarsamente pigmentate. Gli strati che

compongono l'epidermide (corneo, granulare, spinoso e basale) appaiono rosati mentre la melanina si evidenzia come particelle nere distribuita specialmente a livello di strato basale e strato spinoso profondo (Shataer et al., 2020).

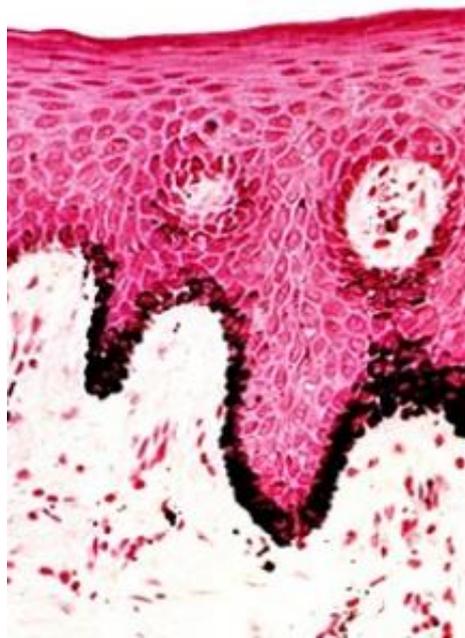


Fig. 18 Colorazione di Fontana-Masson.

4.4.2 COLORAZIONE DI SCHMORL

La colorazione di Schmorl è utilizzata per testare le sostanze riducenti, tra cui melanina, cellule argentaffini e cromaffini, colloide tiroidea, cheratina e lipofuscina. A seconda che si decida o no di colorare il nucleo, si ottengono due risultati diversi: se il nucleo non viene colorato la melanina apparirà arancione e le altre strutture rosa; se il nucleo viene colorato la melanina sarà blu-nera o blu-verde e le altre strutture viola (Shataer et al., 2020).

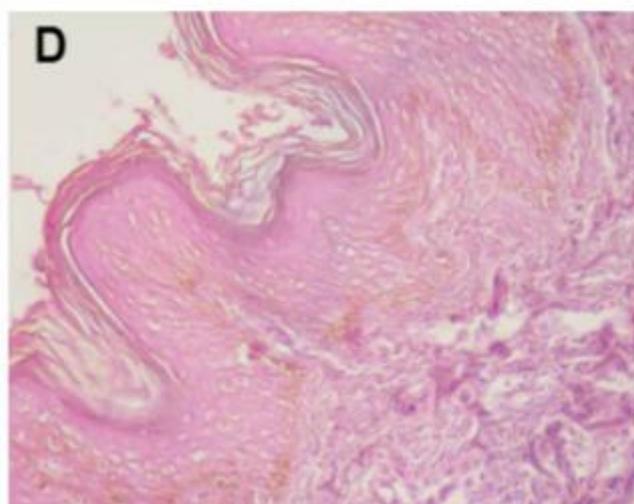
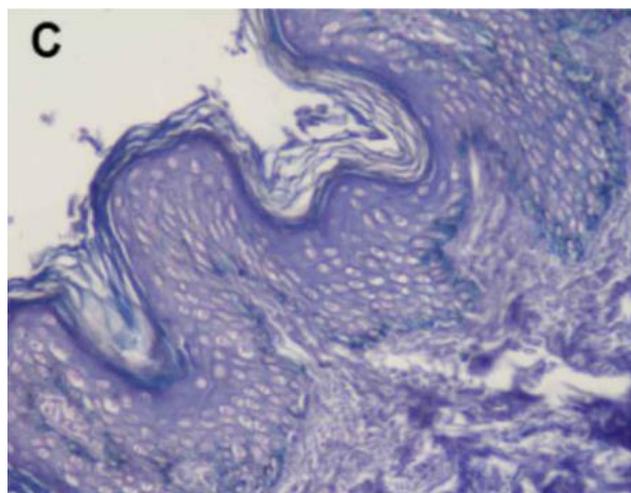


Fig. 17 Colorazione di Schmorl. **C** con colorazione dei nuclei; **D** senza colorazione dei nuclei (Shataer et al., 2020).

4.4.3 COLORAZIONE DI WARTHIN-STARRY

La colorazione di Warthin-Starry è stata sviluppata per l'identificazione delle spirochete ma si presenta in realtà più sensibile rispetto alla colorazione di Fontana-Masson per la visualizzazione della melanina. Ciò nonostante, non è così frequentemente utilizzata. A differenza della colorazione di Fontana-Masson non si produce la cosiddetta "melanin dust", un artefatto visibile nello strato corneo; inoltre si vedono un maggior numero di granuli nei cheratinociti soprabasali raggiungendo numeri simili a quelli riscontrati con il microscopio

elettronico a trasmissione (TEM). Le differenze evidenziate tra le due colorazioni accrescono la questione che con il metodo di Warthin-Starry si possa evidenziare anche la feomelanina (Joly-Tonetti et al., 2016; Lai & Healy, 2016).

5 TERAPIA

5.1 TRATTAMENTO CHIRURGICO

La chirurgia rappresenta senza dubbio la tecnica più efficace per il trattamento del melanoma orale ma anche per quello cutaneo e digitale. È raccomandata la resezione chirurgica con margini ampi, associata a una linfadenectomia regionale, in quanto diversi studi hanno evidenziato la presenza di metastasi a livello dei linfonodi mandibolari, anche se di normali dimensioni (Fonseca-Alves et al., 2021).



Fig. 19 Cane, resezione di melanoma amelanotico con margini di 1-2 cm (Bergman et al., 2012).

Con il trattamento chirurgico il tempo medio di sopravvivenza (TSM) è 17-18 mesi per tumori allo stadio I, 5-6 mesi per lo stadio II e 3 mesi per i MOC allo stadio III (Bergman, 2007).

In uno studio condotto da Tuohy Joanne L. et al. (2014), 70 cani affetti da MOC sono stati trattati esclusivamente con la chirurgia a margini ampi (2-3 cm di margine osseo e 1 cm di margine di tessuto molle). Dalle loro analisi è stato evidenziato che nel 72.9% dei casi la completa rimozione del tumore era associata ad un TSM di 874 giorni, ad una sopravvivenza media libera da progressione della malattia (Progression Free Survival) superiore a 574 giorni e a un tasso di ricaduta intorno al 10%. Risultati comparabili sono stati ottenuti anche da Boston et al. (2014), con un successo del 79.3%, un tasso di ricaduta del 8.3% e un TSM di 354 giorni (Fonseca-Alves et al., 2021).

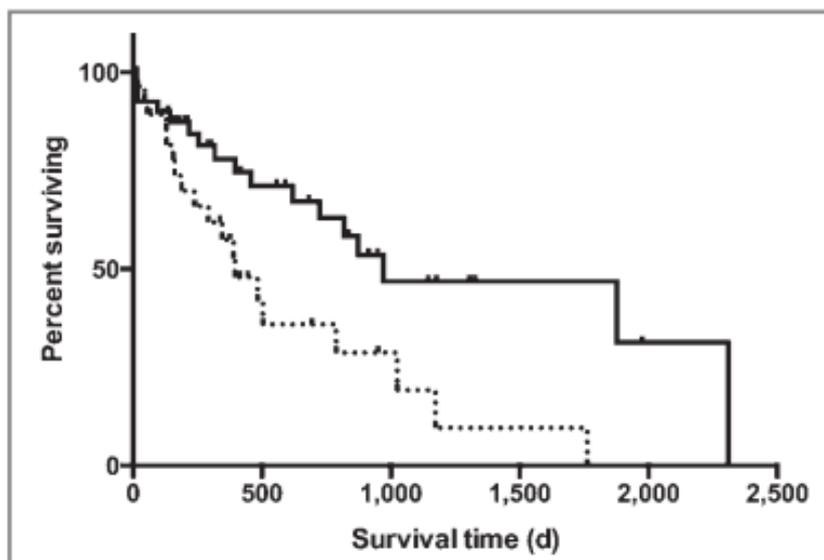


Fig. 20 Curva di sopravvivenza di Keplan-Meier di 70 cani con MOC che hanno subito la chirurgia come unico trattamento. TSM: 874 giorni, PSF > 574 giorni (Tuohy Joanne L. et al., 2014).

5.2 CHEMIOTERAPIA

La chemioterapia gioca un ruolo controverso nel trattamento del MOC in quanto non ci sono ancora sufficienti dati che dimostrino un suo reale beneficio sul tasso di sopravvivenza (Bowl Blacklock et al., 2019); tuttavia può rappresentare una buona scelta terapeutica per pazienti con melanoma diffuso. Valutando il tasso di risposta, si può osservare una certa variabilità in relazione al protocollo farmacologico utilizzato: una risposta del 18% in trattamenti a base di cisplatino e piroxicam, contro un 28% con l'uso del solo carboplatino (Meyer B. & Martin O., 2021). I principali effetti collaterali che può causare sono disordini gastrointestinali e leucopenia transitoria; inoltre la funzionalità renale deve essere monitorata durante tutta la durata del trattamento.

5.3 IMMUNOTERAPIA

L'immunoterapia del MOC si basa sull'uso di un vaccino a DNA xenogenico costituito da un plasmide codificante per uno o più antigeni associati al tumore (TAA) e sembra offrire, se abbinato alla chirurgia, migliori risultati rispetto alla chemioterapia. Il primo vaccino sviluppato, codificante per la tirosinasi umana, Oncept®, prevede un protocollo di 4 somministrazioni per via transdermica ogni 2 settimane, con successivi richiami semestrali (Buracco, 2018). Diversi studi hanno evidenziato risultati non consistenti sull'efficacia di Oncept® sia come trattamento del MOC che come TSM. Questo è probabilmente conseguente al numero limitato di cani coinvolti nei trials e alla scelta dell'antigene, aspetto fondamentale per la buona riuscita della terapia (Meyer B. & Martin O., 2021).

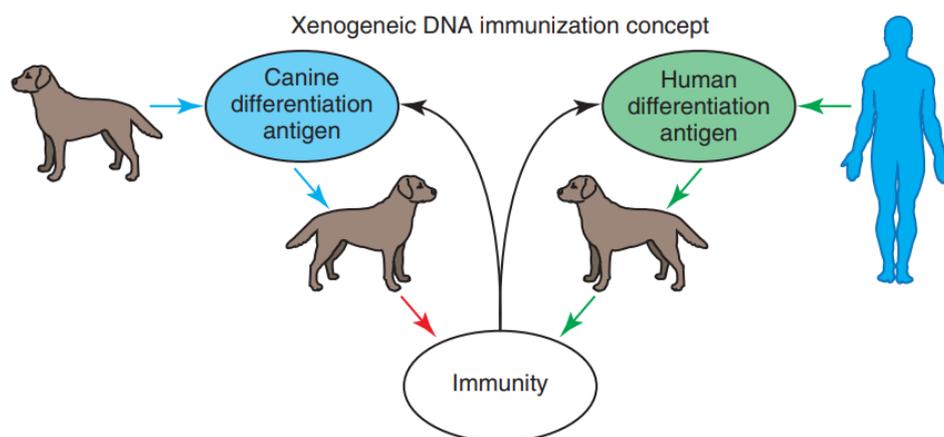


Fig. 21 Illustrazione del concetto di vaccinazione xenogenica (Bergman et al., 2012).

Un altro TAA interessante è il condritin solfato proteoglicano 4 (CSPG4): è espresso in circa il 60% dei MOC ed ha un ruolo essenziale nella proliferazione, adesione, migrazione e sopravvivenza dei melanociti neoplastici. Il protocollo è costituito da due fasi: prima l'elettroporazione, ossia l'utilizzo di brevi impulsi elettrici per creare una temporanea permeabilizzazione della membrana cellulare, seguito dall'inoculazione per via intramuscolare dei plasmidi contenenti il TAA, che possono così penetrare meglio nelle cellule. La pratica richiede l'anestesia generale che ne rappresenta lo svantaggio principale; inoltre i pazienti devono risultare positivi alla CSPG4, essere stadiati clinicamente e aver subito l'escissione chirurgica locale di tumore e linfonodi. Ai pazienti che soddisfano i criteri

di inclusione, si somministrano due vaccinazioni ogni 15 giorni e successivamente con cadenza mensile. Nei cani in cui la sopravvivenza raggiunge i 2 anni, la vaccinazione si riduce a cadenza semestrale. Il TSM osservato con questo protocollo è stato di 684 giorni (Buracco, 2018; Piras et al., 2017).

5.4 RADIOTERAPIA

La radioterapia può essere utilizzata per la riduzione chirurgica della massa in caso di tumori molti grandi, oppure dopo la chirurgia se il melanoma non è stato interamente rimosso. In alternativa, può essere considerato uno strumento palliativo quando non è possibile eseguire l'escissione chirurgica.

Il protocollo principale si basa sull'utilizzo di dosi ipofrazionate da 6-9 Gy settimanali per 3-4 settimane, per una dose totale di 24-36 Gy (McCartan et al., 2021; Buracco, 2018). Il tasso di risposta riportato è del 75-85% con un TSM di 230-363 giorni. (Fonseca-Alves et al., 2021)

Di solito, gli effetti collaterali sono lievi e autolimitanti, e possono includere alopecia, ipo e iperpigmentazione cutanea, radiodermatiti secche e stomatiti.

L'elevato tasso di metastasi del MOC rappresenta il limite principale della radioterapia, rendendola una tecnica più palliativa che curativa (Fonseca-Alves et al., 2021).

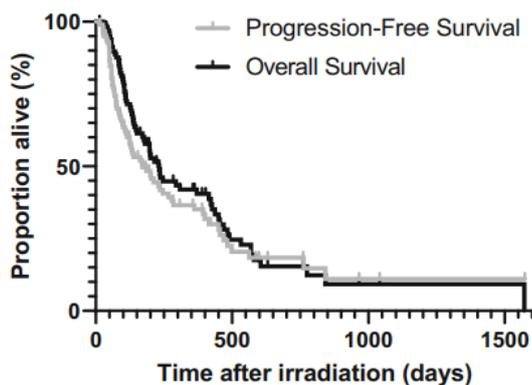


Fig. 22 Curva di Kaplan-Meier che descrive la sopravvivenza libera da progressione e il tempo di sopravvivenza complessivo in seguito a radioterapia in un gruppo di 101 cani (Baja et al., 2022).

6 PROGNOSI

Secondo la WHO, gli indicatori prognostici per il MOC sono: età, localizzazione, stadio, dimensioni, presenza di lisi ossea, markers istologici e immunoistochimici (figura 25).

6.1 ETÀ

Non si osserva un'importante distinzione in termini di TSM per cani anziani (>11 anni) e più giovani. Il problema legato all'età è dovuto principalmente alle complicazioni chirurgiche e anestesologiche che potrebbero verificarsi in caso di escissione chirurgica (Smedley et al., 2022).

6.2 LOCALIZZAZIONE

Generalmente, i melanomi con una peggiore prognosi interessano il letto ungueale, le giunzioni muco-cutanee o la cavità orale. In particolare, è stato riportato che fra i vari tipi di melanomi i MOC hanno il minor TSM. In ogni caso, la sola localizzazione non rappresenta un fattore prognostico rilevante (Smedley et al., 2022).

I tumori localizzati caudalmente al 4° premolare presentano dei margini più estesi e sono solitamente identificati tardivamente riportando un TSM da 4.5 a 7 mesi; per i tumori rostrali invece il TSM riportato è di 7.5-11 mesi.

6.3 STADIO

In uno studio condotto da Meyer B. & Martin O. (2021), è stato evidenziato come il TSM varia a seconda dello stadio (WHO) interessato:

- 2 anni per lo stadio I
- 1 anno per lo stadio II
- 6 mesi per lo stadio III
- 2.5 mesi per lo stadio IV

6.4 DIMENSIONI

Secondo la WHO, un aumento di volume della massa anche solo di 1 cm comporta un incremento del 32% della possibilità di recidiva locale. Inoltre, aumenti di dimensioni possono causare maggiore eterogeneità cellulare e resistenza alla radioterapia.

Per tumori < 4 cm, di stadio I e II, il TSM è di 27 mesi; se le dimensioni superano i 4 cm (stadio III e IV) il TSM si accorcia ad appena 4 mesi (Meyer B. & Martin O., 2021). L'elevata velocità di crescita del MOC sembra essere causata dall'elevata vascolarizzazione a cui si associa un maggior drenaggio e una maggiore diffusione metastatica. Questi elementi costituiscono un ulteriore fattore prognostico negativo per i cani colpiti dalla neoplasia (Poli, 2004).

6.5 LISI OSSEA

Se in seguito a radioterapia o immunoterapia si osserva la comparsa di grave lisi ossea, la recidiva sarà più rapida.

L'assenza di lisi ossea successiva a un trattamento radioterapico comporta un TSM di 9.5 mesi, se invece la lisi ossea è presente il TSM si accorcia a 4 mesi.

Se in seguito a immunoterapia si osserva un'assenza di lisi ossea il TSM si allunga a 1 anno, al contrario se la lisi ossea è presente si riduce a meno di 1 anno (Meyer B. & Martin O., 2021).

6.6 MARKERS ISTOLOGICI

L'istologia fornisce indicatori prognostici importanti, specialmente il grado di differenziazione, l'indice mitotico (IM), il grado di pigmentazione e l'invasione vascolare (Meyer B. & Martin O., 2021; Smedley et al., 2022).

In genere, i MOC a bassa malignità si presentano fortemente pigmentati, non ulcerati, peduncolati e di dimensioni inferiori a 1 cm di diametro. A livello istologico le cellule neoplastiche appaiono uniformi, rotondeggianti o allungate, con un nucleo piccolo che contiene un singolo nucleolo in posizione centrale. Si osservano lieve anisocitosi e anisocariosi, e un indice mitotico basso. Al contrario, i MOC più aggressivi sono

caratterizzati da cellule con morfologia epitelioidale o fusiforme, un indice mitotico alto con anisocitosi e anisocariosi marcate; in genere presentano attività giunzionale e crescita nodulare negli strati sottostanti (Smedley et al., 2022).

Per identificare l'indice mitotico (IM), normalmente si osservano i melanociti neoplastici ad un ingrandimento di 40x (Smedley et al., 2022). Un IM < 4 con una buona differenziazione cellulare si associa ad un TSM di 1-2 anni; al contrario, se MI > 4 con un basso grado di differenziazione il TSM è inferiore a 1 anno (Smedley et al., 2022; Meyer B. & Martin O., 2021).

Anche l'atipia nucleare e il livello di infiltrazione sembrano correlati ad una diminuzione della sopravvivenza. L'atipia nucleare sembra essere maggiormente espressa nelle neoplasie melanotiche di tipo epitelioidale; una soglia del 30% di atipia nucleare, osservata in 100-200 cellule a 40x, può permettere di differenziare l'aggressività della neoplasia (Smedley et al., 2022).

Il grado di infiltrazione neoplastica è un altro importante fattore prognostico, in particolare è stato osservato che i MOC possono infiltrare gli strati sottostanti: mucosa epiteliale, sottomucosa, muscolo scheletrico, ghiandola salivare e osso. Il grado di invasione è direttamente proporzionale all'aggressività del tumore (Smedley et al., 2022).

Non è ancora ben chiaro se la pigmentazione sia un fattore prognostico negativo o positivo. Tuttavia, è stato riportato che i tumori labiali fortemente pigmentati e differenziati mostravano una maggiore sopravvivenza (fig. 23, a). Occorre in ogni caso tener presente che i tumori amelanotici non implicano necessariamente una prognosi peggiore (Freeman, 2007).

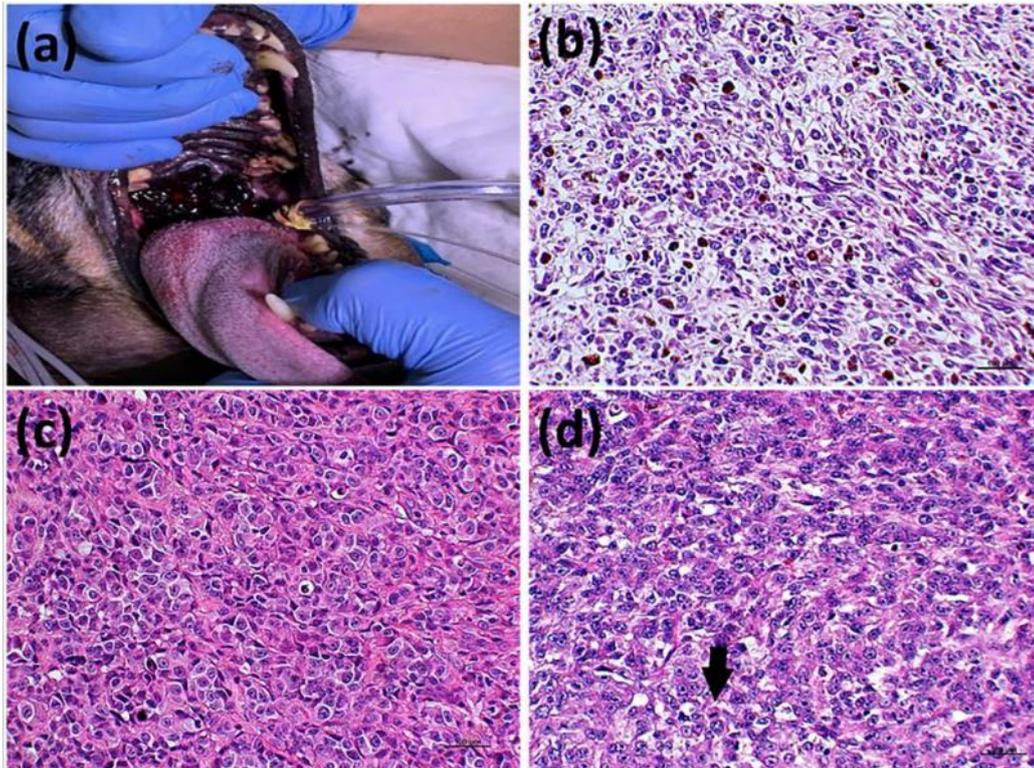


Fig. 23 (a) Cane con MOC fortemente pigmentato sul palato. (b) Valutazione istologica del MOC con livello di pigmentazione <50%. (c) Immagine istologica del MOC con marcata atipia nucleare. (d) Sezione istologica di MOC con mitosi (freccia) (Fonseca-Alves et al., 2021).

Tutti i parametri descritti non possono essere considerati da soli per la valutazione prognostica del MOC, ma devono essere valutati nel loro insieme. Al contrario, l'invasione vascolare è considerato un indicatore fortemente prognostico, anche se valutato singolarmente (Smedley et al., 2022).

6.7 MARKERS IMMUNOISTOCHEMICI

Ki67 è attualmente considerato il marker prognostico più attendibile e utilizzato a livello diagnostico a causa del suo altissimo livello di riproducibilità. Ki67 permette di identificare la frazione di crescita delle cellule neoplastiche in tutte le fasi del ciclo cellulare, tranne in G0. Esso viene valutato nelle aree del tumore non infiammate e non ulcerate, determinando la positività dei nuclei dell'area interessata (Smedley et al., 2022). Per i MOC e i melanomi labiali, le cellule con nucleo marcato sono contate in una griglia di 1 mm³ ad alto

ingrandimento. Il valore di Ki67 viene riportato come il numero medio delle cellule positive contate in 5 diversi campi su griglia (Buracco, 2018).

L'indice di Ki67 maggiore di 19.5 è correlato con una maggiore aggressività del tumore e accorcia il TSM a meno di 1 anno; al contrario si estende a 1-2 anni se l'indice di Ki67 è minore di 19.5 (Meyer B. & Martin O., 2021).

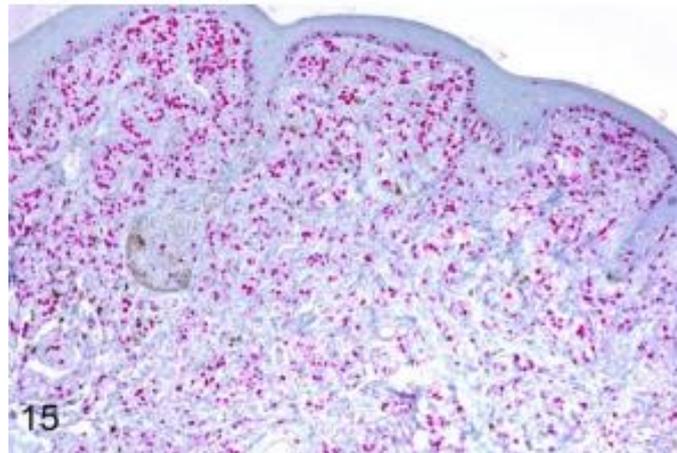


Fig. 24 Melanoma con elevato indice di Ki67 (Smedley et al., 2022).

PROGNOSTIC FACTORS	CHARACTERISTICS	AVERAGE SURVIVAL TIME
Age ^{22,32}	<ul style="list-style-type: none"> Older dogs are more likely to experience complications related to anesthesia and surgery 	Dogs \leq 11 years old: 7 months Dogs $>$ 11 years old: 7 months
Stage ^{16,23}	<ul style="list-style-type: none"> Higher WHO stage is directly linked to decreased survival times and is more likely to have metastasis 	Stage I: 2 years Stage II: 1 year Stage III: 6 months Stage IV: 2.5 months
Tumor size ^{22,31}	<ul style="list-style-type: none"> Every 1-cm increase in size was associated with a 32% increase in local recurrence³¹ Increased size can lead to tumor heterogeneity and increased radioresistance The effect of size is similar to stage, as WHO stages include size of the tumor 	Small tumors $<$ 4 cm (stage I/II): 27 months Large tumor \geq 4 cm (stage III/IV): 4 months
Bone lysis ^{22,28}	<ul style="list-style-type: none"> Greater degree of bony lysis has been associated with quicker time to recurrence after radiation and immunotherapy 	Radiation: Absence of lysis: 9.5 months Presence of lysis: 4 months Immunotherapy: Absence of lysis: $>$ 1 year Presence of lysis: $<$ 1 year
Histology ²⁸	<ul style="list-style-type: none"> Histologic markers, specifically mitotic index (MI) and degree of differentiation, are linked to prognosis 	MI $<$ 5 and well-differentiated cells: 1-2 years MI $>$ 5 and undifferentiated cells: $<$ 1 year
Immunohistochemistry ³²	<ul style="list-style-type: none"> High levels of Ki67, a marker for tumor growth, are highly correlated to more aggressive and higher-stage tumors 	Ki67 Index \geq 19.5: $<$ 1 year Ki67 Index $<$ 19.5: 1-2 years
Location ^{7,22}	<ul style="list-style-type: none"> Tumors caudal to the 4th premolar present more difficult margins and are identified at later stages 	Rostral tumors: 7.5-11 months Caudal tumors: 4.5-7 months

Fig. 25 Indicatori prognostici di MOC (Meyer B. & Martin O., 2021).

7 ANGIOGENESI

L'angiogenesi è il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni.

Essa può essere distinta in fisiologica, quando favorisce la crescita e lo sviluppo dell'organismo, e in patologica quando favorisce il peggioramento di una malattia (Adair TH & Montani JP, 2010).

Quando una cellula sana si trasforma in cellula tumorale inizia a proliferare e, di conseguenza, il primo nucleo di cellule neoplastiche necessita di nutrienti ma anche di eliminare le sostanze di scarto. Tutti questi scambi avvengono attraverso i vasi sanguigni. Mentre il tumore è ancora di piccole dimensioni riesce a sopravvivere sfruttando i capillari già esistenti, ma a mano a mano che cresce e aumenta di dimensioni, dovrà crearsi una propria rete vascolare (Lugano et al., 2020).

7.1 PROCESSO DI ANGIOGENESI

L'angiogenesi è regolata dall'equilibrio di fattori angiogenici e fattori anti-angiogenici. La crescita dell'endotelio vascolare è stimolata da fattori angiogenici che si dividono in regolatori diretti, ossia che agiscono sulle cellule endoteliali, e regolatori indiretti, che influenzano le funzionalità di cellule accessorie come monociti, mastociti e cellule T, oppure stimolano le cellule endoteliali a produrre fattori con azione diretta (Lugano et al., 2020).

I principali induttori angiogenici sono (Lugano et al., 2020):

- TNF- α (tumor necrosis factor α): agisce sulle cellule endoteliali inducendo la produzione di fattore proteico B61, fosfolipide PAF (platelet-activating factor) e ossido nitrico.
- VEGF (vascular endothelial growth factor): si tratta di una glicoproteina che promuove la proliferazione endoteliale quando si lega al suo recettore (VEGFRs), presente sull'endotelio vascolare. L'espressione di VEGF è aumentata quando sono presenti tumori, zone necrotiche ed ipossiemia.
- FGF (fibroblast growth factor): sono una famiglia di fattori di crescita, il cui legame con il loro recettore (FGFR) induce, tra le varie azioni, proliferazione cellulare, capacità d'invasione tumorale e angiogenesi.

- PDGF (platelet-derived growth factor): si tratta di un fattore di crescita secreto dalle piastrine attivate, dalle cellule endoteliali, epiteliali, gliali ed infiammatorie. Il PDGF ha come cellule bersaglio periciti, fibroblasti, cellule muscolari lisce, gliali e mesangiali. Promuove la maturazione e il reclutamento di periciti inducendo l'up-regolazione di VEGF.

Il processo di angiogenesi è fisiologicamente caratterizzato da 5 fasi (Potente et al., 2011):

1. Liberazione dei mediatori pro-angiogenici, in genere causata da ipossia del tessuto coinvolto.
2. Aumento della permeabilità dei vasi con perdita di connessione tra le cellule endoteliali.
3. Migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali con liberazione di enzimi proteolitici (metalloproteasi) che modificano la matrice extracellulare, rendendo più facile la migrazione delle cellule endoteliali.
4. Differenziamento dei vasi caratterizzato da un arresto della proliferazione e dalla formazione di capillari primitivi. In questa fase si verifica l'apertura del lume del futuro capillare tramite l'accumulo e la fusione di vescicole pinocitiche con formazione di cavità all'interno delle cellule endoteliali.
5. Stabilizzazione dei vasi tramite il richiamo di strutture di supporto come i periciti e le cellule della muscolatura liscia.

7.2 ANGIOGENESI TUMORALE

Il processo di angiogenesi tumorale (*angiogenic switch*) ha un ruolo fondamentale per la sopravvivenza del tumore e lo sviluppo di metastasi. Senza un processo angiogenetico si creerebbe uno stato di ipossia e di mancanza di nutrienti, ovvero si creerebbe un ambiente avverso alla sopravvivenza delle cellule neoplastiche (Brocca et al., 2019).

Inizialmente, le masse tumorali sfruttano il flusso sanguigno proveniente da vasi ematici già esistenti ma, a mano a mano che le loro dimensioni aumentano inducono la formazione di nuovi vasi attraverso diversi meccanismi molecolari che iniziano attraverso la stimolazione di molecole pro-angiogeniche. Tale processo è denominato "*angiogenic switch*" (Lugano et al., 2020). L'aspetto chiave dell'*angiogenic switch* (figura 26) è che il tumore passa da una

fase di quiescenza vascolare ad una fase attiva, dove può crescere e diffondersi rapidamente grazie alla presenza dei nuovi vasi. I fattori pro-angiogenici coinvolti sono i medesimi presenti anche nell'angiogenesi fisiologica, ma la loro produzione non è controllata e di conseguenza i vasi che si formano presentano (Lugano et al., 2020):

- forma irregolare
- diametro maggiore
- presenza di strutture aberranti
- presenza di cellule tumorali incorporate nella parete dei vasi
- distacco parziale dei periciti dalle cellule endoteliali
- distribuzione non uniforme con flussi di sangue irregolari all'interno
- frequenti emorragie

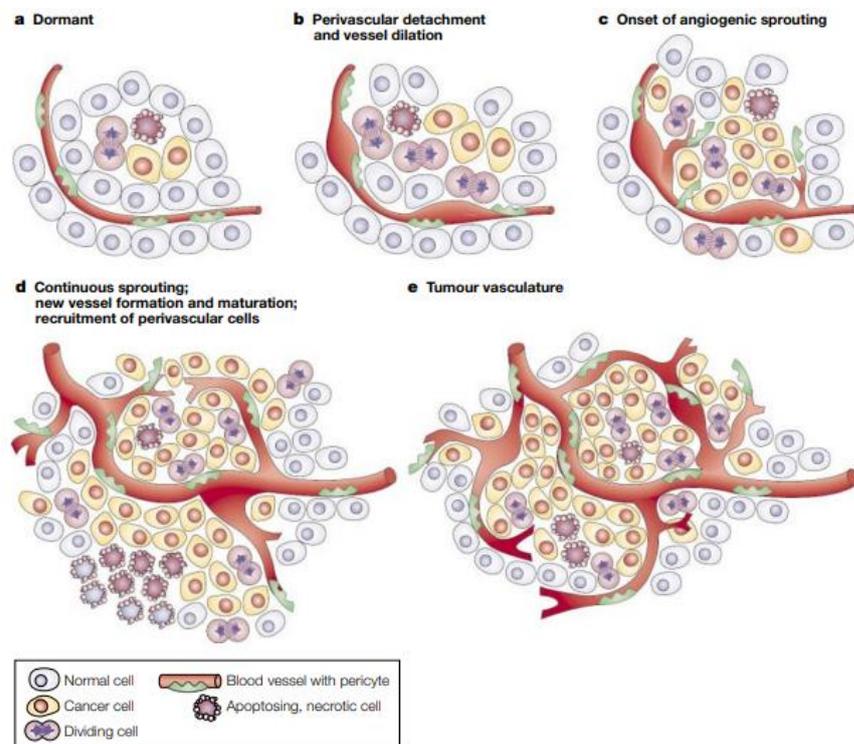


Fig. 26 Angiogenic switch. I tumori iniziano a crescere come noduli non vascolarizzati (a), poi lo switch inizia con il distacco perivascolare e la dilatazione dei vasi (b) seguito dalla gemmazione (*sprouting*) (c), i nuovi vasi si stabilizzano e richiamano nuove cellule perivascolari (d) e l'angiogenesi continua durante tutta la crescita del tumore (e) (Bergers & Benjamin, 2003).

L'angiogenesi non sembra essere l'unico meccanismo coinvolto nello sviluppo di nuovi vasi; infatti, diversi studi riportano ulteriori meccanismi di crescita vascolare sia attuato dalle cellule progenitrici dal midollo osseo o direttamente dalle cellule tumorali (Lugano et al., 2020).

7.3 VALUTAZIONE DELL'ANGIOGENESI NEL MELANOMA

7.3.1 ENDOTELINE

Le endoteline sono una classe di proteine di 21 aminoacidi (ET-1, ET-2, ET-3), le cui funzioni includono vasocostrizione e stimolazione della proliferazione cellulare delle cellule endoteliali (Lüscher & Barton, 2000). Esse possono legarsi a due sottotipi recettoriali, ETAR e ETBR, espressi in diversi tessuti, tra cui cellule endoteliali, epitelio renale, tessuto riproduttivo e sistema nervoso centrale (Bagnato et al., 2011).

Il legame con ETAR causa vasocostrizione e proliferazione cellulare, quello con ETBR produce rilascio di ossido nitrico, prostaciline, aumento della clearance di ET-1 e inibizione della sintesi di nuove endoteline. Normalmente esiste una situazione di equilibrio tra le endoteline e gli agenti vasodilatatori, quali ossido nitrico (NO) e prostaciline; ma se le endoteline sono sintetizzate in maniera eccessiva l'equilibrio viene meno, e si ha un maggior rischio di sviluppare ipertensione e malattie cardiovascolari (Lüscher & Barton, 2000).

7.3.2 RECETTORE DELL'ENDOTELINA DI TIPO B NEL MELANOMA

Nell'uomo è stato osservato che le endoteline hanno un ruolo rilevante nelle cellule tumorali, promuovendo lo sviluppo e la progressione del cancro attraverso la proliferazione cellulare, l'evasione dall'apoptosi, l'angiogenesi e la disseminazione metastatica.

Alterazioni nel rapporto ETAR/ETBR possono causare il differenziamento di cellule da un normale fenotipo ad uno maligno. In particolare, nei melanomi maligni, è stata osservata una sovra espressione di ETBR, fenomeno su cui si basa il suo utilizzo come marker immunohistochimico (Bagnato et al., 2011).

ET-1, ET-3 e ETBR sono coinvolti nella trasformazione dei melanociti in melanomi, attraverso un processo di de-differenziazione dei melanociti maturi (Saldana-Caboverde & Kos, 2010).

Diversi studi hanno dimostrato una correlazione positiva tra un aumento dell'espressione di ETBR e un fenotipo aggressivo di melanoma. È stato dimostrato un aumento della produzione di ET-1, da parte dei cheratinociti, in risposta ai raggi UV, alla chemiotassi e alla produzione di pigmento nei melanociti. Questo aumento conduce a una maggiore secrezione di HIF-1 α (fattore di trascrizione alfa inducibile da ipossia) con conseguente sovrapproduzione dei fattori di crescita endoteliale (VEGF), sovra-espressione di COX-1 e COX-2 e maggiore attività di PGE₂. Un blocco di ETBR sopprimerebbe l'insorgenza di questa catena e di conseguenza la crescita tumorale e la neovascolarizzazione (Said & Theodorescu, 2012).

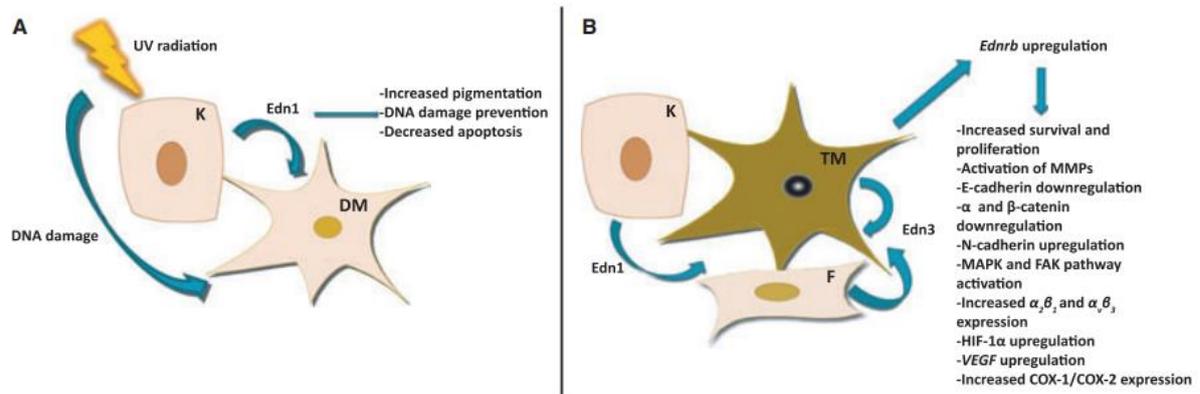


Fig. 27 Gli effetti di ET-1 (Edn1) e ETBR (Ednrb) nella trasformazione dei melanociti. (K= cheratinocita, DM= melanocita differenziato, F= fibroblasto, TM=melanocita trasformato) (Saldana-Caboverde & Kos, 2010).

8 METILAZIONE

8.1 EPIGENETICA

L'epigenetica è una branca della genetica che si occupa dello studio delle modificazioni ereditabili. È stata introdotta nei primi anni Quaranta da Conrad Waddington che l'ha definita come “lo studio delle interazioni casuali tra i geni e i loro prodotti che danno origine al fenotipo”. Con la rapida crescita dello studio della genetica attualmente l'epigenetica è definita come “lo studio dei cambiamenti nella funzione genica che sono mitoticamente e/o meioticamente ereditabili e che non comportano un cambiamento nella sequenza del DNA”. I cambiamenti epigenetici sono delle modificazioni del DNA che di conseguenza causano una “disattivazione” o una “attivazione” dei geni per cui codificano. La conseguenza dei cambiamenti epigenetici è che il gene sarà più o meno trascritto in mRNA e quindi tradotto in proteina (Dupont et al., 2009).

Tra i principali meccanismi epigenetici si osservano le modificazioni degli istoni, le sequenze di microRNA non codificanti (miRNA) e la metilazione del DNA (Gibney & Nolan, 2010).

8.1.1 MODIFICAZIONI DEGLI ISTONI

Nella cellula eucariote, il DNA e le proteine istoniche formano la cromatina. L'unità base della cromatina è il nucleosoma, che consiste in un ottamero di due molecole, ciascuna costituita da quattro istoni (H2A, H2B, H3 e H4). Un altro tipo di istone è detto linker (H1), lega il DNA tra i nucleosomi. La funzione degli istoni è aiutare a “impacchettare” il DNA contenuto nel nucleo della cellula ma hanno anche un ruolo nella regolazione dell'espressione genica (Gibney & Nolan, 2010).

Gli istoni possiedono delle code basiche cariche positivamente che protrudono dal nucleosoma prendendo contatti con i nucleosomi adiacenti, le code N-terminali e C-terminali, e possono subire delle mutazioni post traduzionali, come l'acetilazione, la metilazione e la fosforilazione (Bannister & Kouzarides, 2011; Crusio et al., 2019).

Queste modificazioni possono cambiare la carica elettrica e la struttura delle code istoniche che si legano al DNA, alterando lo stato della cromatina e la conseguente espressione genica (Crusio et al., 2019).

8.1.2 microRNA (miRNA)

I miRNA sono delle piccole sequenze non codificanti di RNA che regolano l'espressione di target genetici specifici. Attualmente sono stati identificati oltre 2500 miRNA, il cui ruolo è di regolare negativamente l'espressione genica, attraverso l'inibizione della trascrizione e/o la degradazione dell'mRNA, senza modificare la sequenza genica.

L'espressione dei miRNA è regolata dalle modificazioni epigenetiche come la metilazione del DNA e le modificazioni istoniche, ma allo stesso tempo i miRNA controllano anche l'espressione dei regolatori epigenetici, tra cui la DNA metiltransferasi e l'istone deacetilasi. Questo meccanismo consiste in un doppio feedback negativo, in cui l'inibizione da parte del miRNA di un regolatore epigenetico è controllata, a livello epigenetico, dallo stesso regolatore (Taufiqul Arif et al., 2020).

8.1.3 METILAZIONE DEL DNA

La metilazione del DNA è un tipo comune di modificazione epigenetica e riguarda l'aggiunta di piccoli gruppi metili, costituiti da un atomo di carbonio e tre di idrogeno, ai nucleotidi di DNA (figura 28). Quando i gruppi metili sono presenti su specifiche basi azotate di un gene, quest'ultimo è silenziato e quindi non produrrà alcuna proteina (Moore et al., 2013).

In modo particolare si osserva la conversione della citosina in 5-metilcitosina nei dinucleotidi CpG, elementi ripetitivi presenti nelle regioni promotrici del genoma.

I cluster di CpG, che prendono il nome di isole CpG, sono stati trovati in circa la metà dei geni promotori del genoma dei mammiferi (Hardwick, 2021; Ishizaki et al., 2020).

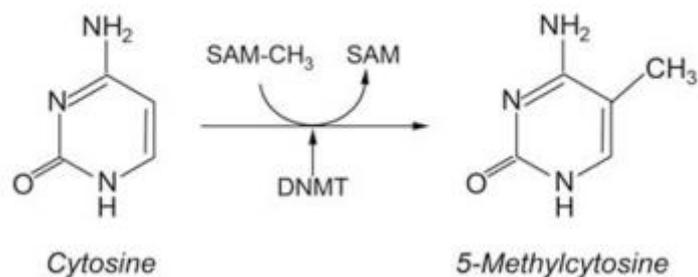


Fig. 28 Conversione della citosina in 5-metilcitosina per opera della DNA metiltransferasi (Gibney & Nolan, 2010).

Nei vertebrati, più dell'80% dei dinucleotidi CpG, localizzati al di fuori delle isole CpG, sono normalmente metilati, al contrario di quelli presenti nelle isole, che generalmente non sono metilati o possiedono dei livelli bassi di metilazione (Gibney & Nolan, 2010).

Infatti, la metilazione delle isole CpG delle regioni regolatrice dei geni oncosoppressori causa un'impossibilità del legame con il fattore di trascrizione e quindi il silenziamento dell'espressione genica (Daniel et al., 2011; Moore et al., 2013). Nello specifico, il meccanismo di ipermetilazione delle isole CpG nelle regioni promotrici durante la carcinogenesi è la risultante di tre meccanismi: la metilazione della citosina a 5-metilcitosina facilita la deaminazione di quest'ultima in timina (transizione C→T), la metilazione aberrante del DNA può essere associata a perdita allelica e i geni oncosoppressori possono essere inattivati dall'ipermetilazione del DNA. In particolare, la transizione C→T è stata osservata frequentemente nell'oncosoppressore p53 (Daniel et al., 2011).

In aggiunta, è stata osservata frequentemente nei tumori anche un'ipometilazione globale che potrebbe facilitare l'instabilità cromosomica (Ishizaki et al., 2020) e cambiamenti strutturali nei cromosomi, anche se questi due meccanismi non sono ancora del tutto chiari (Daniel et al., 2011).

Nell'uomo è stata osservata la presenza di geni promotori ipometilati durante la carcinogenesi, come il gene MAGE nei melanomi e la ciclina D2 nei tumori gastrici. Le cellule cancerogene con oncogeni ipometilati tendono a sovra esprimere le proprie proteine; quindi, l'ipometilazione può contribuire all'espressione degli oncogeni (Daniel et al., 2011). In uno studio condotto da Scattone et al. nel 2021, è stata quantificata la metilazione del DNA in campioni di melanoma amelanotico e melanotico canino attraverso il prelievo di

sangue periferico e l'analisi dei linfociti. Confrontando i pattern di metilazione tra i due tipi di melanoma, è stato osservato che il pattern di ipometilazione è quello maggiormente espresso, senza però differenze statisticamente significative tra tumore melanotico e amelanotico. Quantificare il grado di metilazione del DNA nei linfociti circolanti potrebbe portare a capire il ruolo dell'influenza ambientale nel cancro, questo perché la metilazione del DNA è influenzata dallo stile di vita e dai fattori ambientali (Scattone et al., 2021).

9 OBIETTIVO DELLA TESI

Questo studio nasce dalla collaborazione con l'Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), in particolare con il professore Antonio Jose Ramis Salva e con la dottoressa Barbara Serrano e il Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione (BCA) dell'Università degli studi di Padova, nata dalla mia esperienza presso la struttura spagnola nell'ambito del progetto Erasmus+Studio.

Tale collaborazione ha condotto alla raccolta di ulteriori campioni di MOC dall'archivio dell'Hospital Clinic Veterinari di Barcellona (HCV), volti ad ampliare ed integrare un precedente studio realizzato nel 2022 dal Dipartimento BCA.

L'obiettivo generale della tesi era quello di verificare se l'aumento del numero di casi da sottoporre allo studio, potesse far variare la significatività statistica degli studi precedenti. Si è quindi svolto uno studio immunohistochimico che valutasse sia il profilo di metilazione del DNA (5-mC) e del recettore di tipo B dell'endotelina (ETBR) per una verifica del loro potenziale ruolo prognostico nel MOC.

10 MATERIALI E METODI

10.1 CAMPIONI DI MELANOMA ORALE CANINO

Per questo studio sono stati utilizzati 11 campioni biotici d'archivio di melanoma orale canino, tutti provenienti dal Hospital Clínic Veterinari della Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) e analizzati presso il Laboratorio di Anatomia Patologica Veterinaria del Dipartimento BCA-UNIPD nel periodo compreso tra ottobre 2022 e aprile 2023.

La diagnosi di MOC è stata poi confermata tramite la valutazione di sezioni istopatologiche con colorazione con ematossilina-eosina (HE) e osservazione tramite microscopio.

Il criterio di inclusione, oltre alla diagnosi istopatologica confermata separatamente da due patologi veterinari certificati, era la presenza di dati anamnestici completi di follow-up ottenuti tramite l'analisi delle cartelle cliniche dei pazienti.

Partendo da un database di 47 casi clinici, sono stati ottenuti 11 casi clinici con anamnesi completa, 5 maschi e 6 femmine, vissuti in un periodo di tempo compreso tra il 2000 e il 2020. Tra gli 11 casi, 1 campione è un melanoma amelanotico e il tempo medio di sopravvivenza è di 400 giorni.

Le razze interessate includevano Pastore Tedesco, Schnauzer gigante, Golden Retriever, Cane da Pastore Catalano e meticci.

Le sedi colpite erano singole e/o multiple: gengiva, lingua, mandibola, palato.

La sede prevalente era la gengiva.

Le informazioni più importanti per lo studio erano la data di diagnosi del melanoma e la data di morte dei pazienti. Tutti i cani coinvolti nello studio sono attualmente morti.

Per ogni blocchetto di paraffina del singolo campione sono state tagliate al microtomo sei sezioni di quattro micron da cui sono stati allestiti i vetrini di tipo TOMO.

10.2 IMMUNOISTOCHEMICA

Prima della prova immunohistochemica, i vetrini sono stati introdotti in stufa a 70°C per 20 minuti perché i tessuti erano fissati in formalina e inclusi in paraffina. Dopodiché è stata eseguita l'immunohistochemica su ciascun vetrino.

La macchina utilizzata è “Ventana Medical Systems” (BenchMark GX), che permette di colorare contemporaneamente fino a 20 vetrini.



Fig. 29 Macchina per l’immunoistochimica.

Come controllo positivo e negativo (“White”), sono state tagliate sei sezioni di quattro micron di adenocarcinoma mammario canino. Questa neoplasia è stata scelta come controllo positivo a seguito dei dati riportati in letteratura (Biondi et al., 2021).

Sono stati realizzati due protocolli “Red EndothE R 1:750 block” e “Red 5-mC 1:150” (procedura: BMK ultraView red Par) che differiscono per l’anticorpo primario usato, rispettivamente Anti-Endothelin B Receptor/ET-B antibody (ab117529) di coniglio e Anti-Methycytosine (5-mC) antibody (ab10805) di topo.

Il protocollo utilizzato per primo è stato “Red EndothE R 1:750 block” (procedura: BMK ultraView red Par), il cui allestimento è il seguente:

- Ogni vetrino è stato etichettato con il codice di riferimento interno e inserito nell’apposita postazione della macchina;
- È stato eseguito lo smascheramento dell’antigene per 90 minuti;
- Nel mentre, l’anticorpo primario Anti-Endothelin B Receptor/ET-B antibody (ab117529; rabbit polyclonal to Endothelin B Receptor/ET-B, 100 µl) è stato diluito

con “Ventana Antibody Diluent with casein” alla concentrazione 1:100 e incubato per 32 minuti;

- L’anticorpo primario è stato applicato manualmente su ciascun vetrino;
- Incubazione con l’anticorpo secondario: Ab anti-rabbit 9400 Vector PI-1:50;
- Dopo circa 3 ore e 30 minuti la tecnica immunistochemica automatica si è conclusa e i vetrini sono stati rimossi dalla macchina;
- In seguito, sui vetrini sono stati eseguiti tre lavaggi con acqua distillata e sapone di circa dieci minuti ciascuno;
- Una volta asciugati sotto cappa sterile, i vetrini sono stati montati per la valutazione al microscopio ottico.

Dopodiché è stato realizzato il secondo protocollo “Red 5-mC 1:150”:

- Ogni vetrino è stato etichettato con il codice di riferimento interno e inserito nell’apposita postazione della macchina;
- È stato eseguito lo smascheramento dell’antigene per 90 minuti;
- Nel mentre, l’anticorpo primario Anti-methylcytosine (5-mC) antibody (ab10805) è stato diluito con “Ventana Antibody Diluent with casein” alla concentrazione 1:150 e incubato per 32 minuti;
- L’anticorpo primario è stato applicato manualmente su ciascun vetrino;
- Incubazione con l’anticorpo secondario: Ab anti-rabbit 9400 Vector PI-1:50;
- Dopo circa 3 ore e 30 minuti la tecnica immunistochemica automatica si è conclusa e i vetrini sono stati rimossi dalla macchina;
- In seguito, sono stati eseguiti tre lavaggi con acqua distillata e sapone di circa dieci minuti ciascuno;
- I vetrini, una volta asciugati sotto cappa sterile, sono stati montati per la valutazione al microscopio ottico.

10.3 SCORE IMMUNOISTOCHEMICO

I vetrini sono stati valutati al microscopio ottico sulla base della loro percentuale di positività all’immunistochemica con metodica semiquantitativa.

La positività attesa era nucleare nel caso di 5-mC, di membrana nel caso di ETBR.

Inizialmente si è deciso di classificare i campioni in macrocategorie così definite:

- *Mild*: 0% - 33% di cellule neoplastiche immunoreattive
- *Moderate*: 34% - 66% di cellule neoplastiche immunoreattive
- *Severe*: 67% - 100% di cellule neoplastiche immunoreattive

Successivamente, per ogni campione, è stato deciso di descrivere solamente la percentuale di cellule neoplastiche immunoreattive senza utilizzare alcuna categoria.

È stato deciso di effettuare queste due valutazioni (con e senza categorie) a scopo statistico.

10.4 ANALISI STATISTICA

L'analisi è stata eseguita considerando la totalità dei campioni, ossia 33 casi.

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati i seguenti programmi:

- Excel, GraphPad Prism 8, per le categorie
- R, per le sole percentuali

La prima valutazione statistica ha posto in correlazione le categorie immunoistochimiche con il TSM; mentre la seconda valutazione statistica ha confrontato la percentuale di cellule immunoreattive con il TSM.

I test eseguiti sulle categorie sono stati test ANOVA e test di normalità.

Mentre, è stata svolta un'ulteriore analisi statistica sulla base delle percentuali di positività attraverso *test di correlazione Pearson* (sia tramite programma Excel che R).

11 RISULTATI

I casi studiati sono stati aggiunti ai 22 campioni già analizzati durante uno stesso studio svolto nel 2022 dal professor M. Castagnaro, presso il Laboratorio di Anatomia Patologica Veterinaria di BCA.

ID	SESSO	ETÀ (anni)	TS (giorni)	POSITIVITÀ 5-mC	POSITIVITÀ ETBR	NOTE
G1369/05	M	8	589	Severe	Moderate	5-mC: cheratinociti + ETBR: cheratinociti -
G2973/05	F	14	581	Moderate	Moderate	5-mC: cheratinociti + ETBR: cheratinociti +
G98/07	M	12	821	Mild	Moderate	
G574/07	F	13	134	Mild	Mild	5-mC: cheratinociti - ETBR: cheratinociti +
G1282/08	M	14	410	Severe	Moderate	5-mC: cheratinociti + ETBR: cheratinociti -
G1291/09	F	16	38	Severe	Severe	5-mC: epitelio non valutabile ETBR: cheratinociti +
G667/11	M	14	219	Moderate	Severe	
G433/11	F	12	14	Moderate	Severe	5-mC: cheratinociti + ETBR: cheratinociti -
G159/12	M	20	188	Severe	Moderate	
G166/14	F	3	290	Severe	Severe	
G520/17	F	14	1115	Severe	Severe	5-mC: cheratinociti + ETBR: cheratinociti -

Fig. 30 Tabella riassuntiva dei risultati. Per ogni campione è descritto sesso, età, tempo di sopravvivenza (TS) in giorni, categoria di immunoreattività, e note aggiuntive.

ID	TS (giorni)	POSITIVITÀ 5-mC	POSITIVITÀ ETBR
AA087	48	90%	80%
AC432	105	60%	5%
AD153	350	80%	20%
AD427	41	60%	5%
AD807	648	50%	50%
AF136	4	20%	40%
AF718	351	20%	20%
AF814	219	70%	80%
AF959	603	60%	50%
AG181	60	50%	80%
AG241	165	95%	60%
AH295	498	10%	10%
AH394	70	10%	80%
AH742	19	30%	90%
AH812	96	35%	50%
AH907	137	20%	90%
AI480	173	50%	75%
AI496	29	75%	95%
AJ311	60	50%	20%
AJ433	110	50%	30%
AJ970	35	60%	75%
AK137	200	50%	90%
G1369/05	589	100%	30%
G2973/05	581	70%	60%
G98/07	821	10%	70%
G574/07	134	20%	20%
G1282/08	410	90%	30%
G1291/09	38	100%	70%
G667/11	219	70%	50%

G433/11	14	70%	70%
G159/12	188	100%	40%
G166/14	290	100%	100%
G520/17	1115	90%	100%

Fig. 31 Percentuale di positività all'immunoistochimica. Per ogni campione è descritto tempo di sopravvivenza (TS) in giorni e categoria di immunoreattività. I campioni da AA87 a AK137 appartengono allo studio del 2022.

È stato osservato che, nel caso dell'ETBR, la positività osservata non era solo di membrana come ci si aspettava, ma anche citoplasmatica (granulare) e nucleare.

Per ciascuna categoria considerata sono state selezionate delle foto esplicative:

Mild

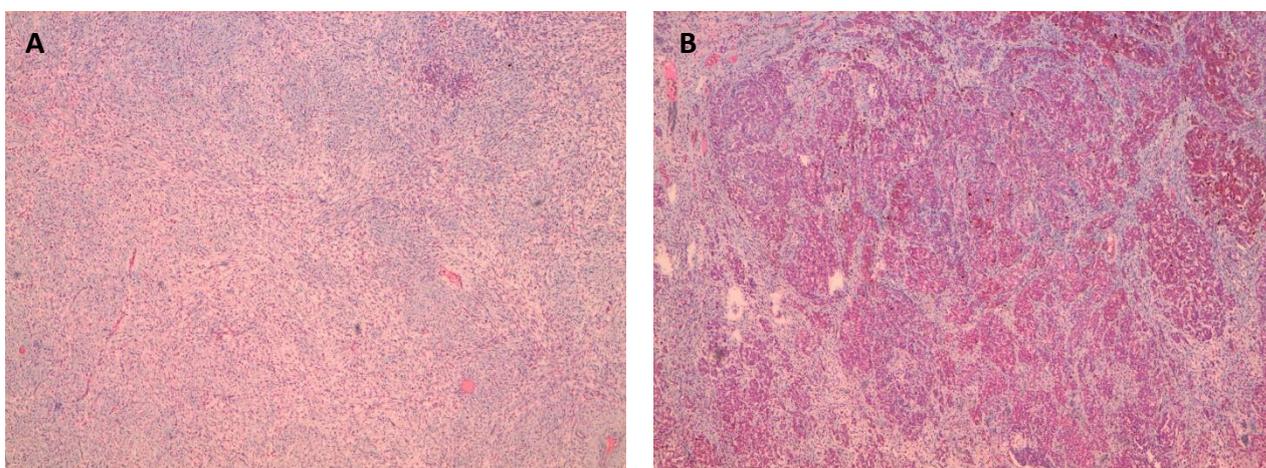


Fig. 32 Campione 574/07, ingrandimento 5x. **A** positività ETBR. **B** positività 5-mC.

Moderate

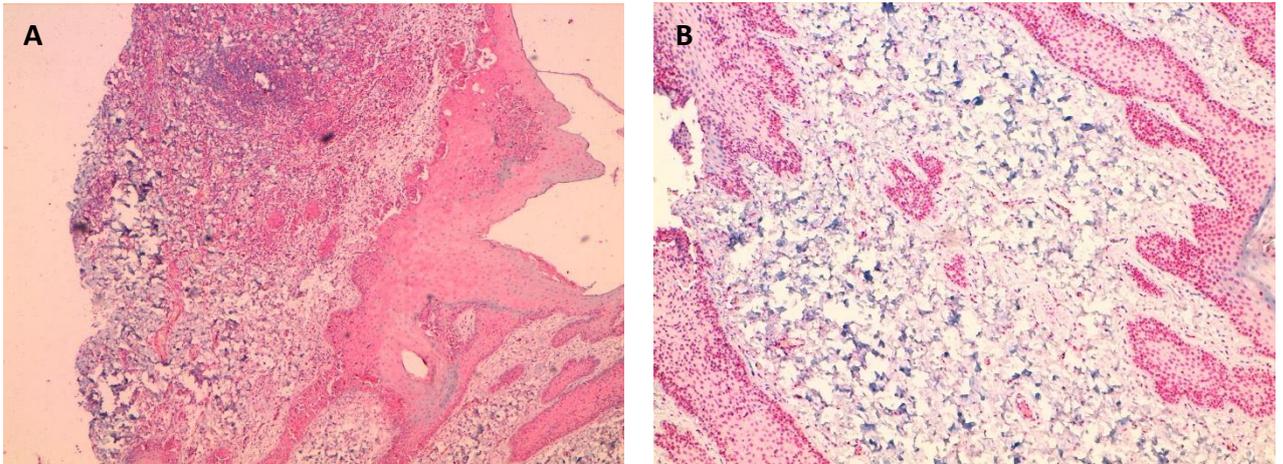


Fig. 33 Campione 2973/05, ingrandimento 5x. **A** positività ETBR. **B** positività 5-mC.

Severe

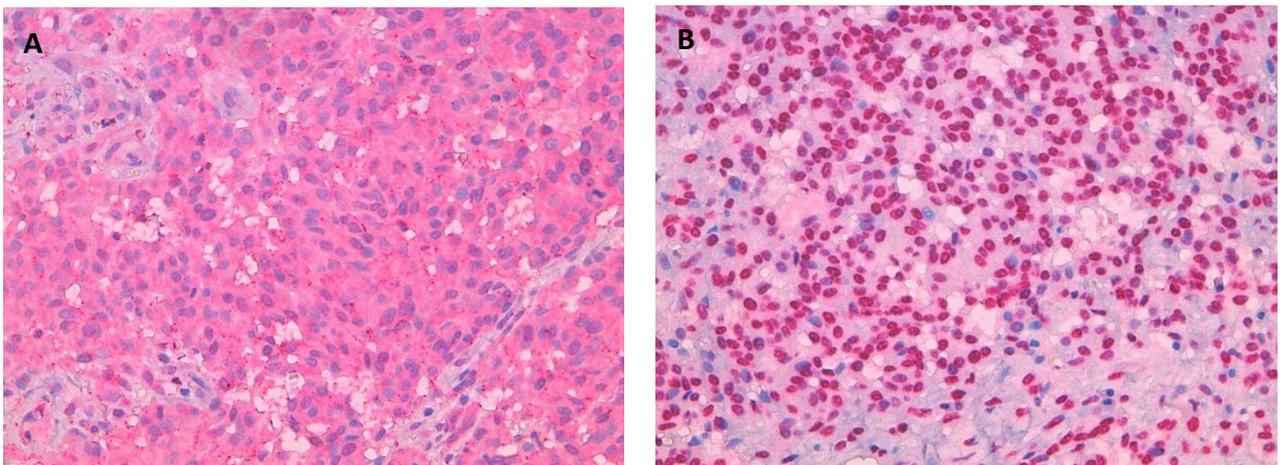


Fig. 34 Campione 1291/09, ingrandimento 40x. **A** positività ETBR. **B** positività 5-mC.

I risultati ottenuti hanno mostrato un'assenza di correlazione statisticamente significativa tra ETBR e 5-mC con il tempo di sopravvivenza (figura 35-36).

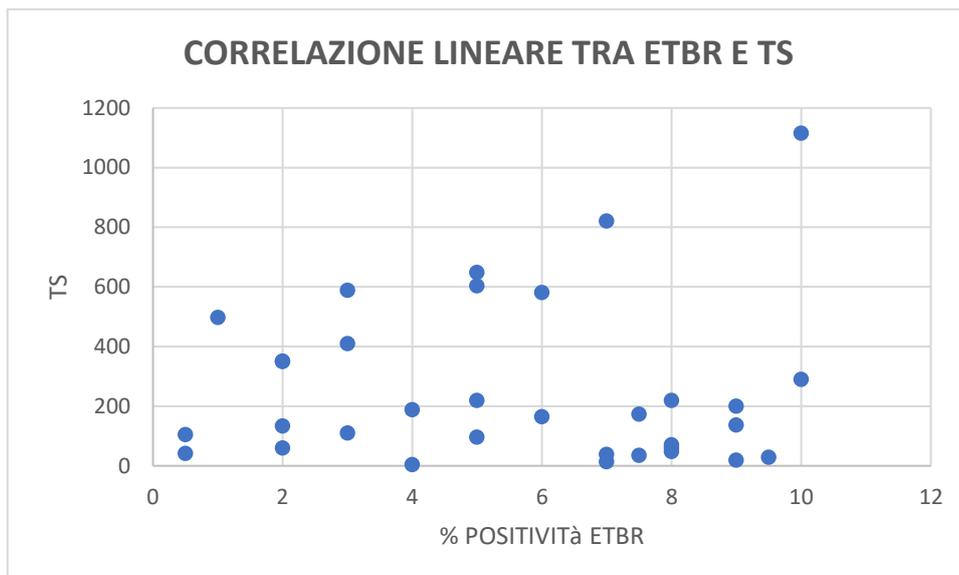


Fig. 35 Grafico correlazione lineare ETBR e TS.

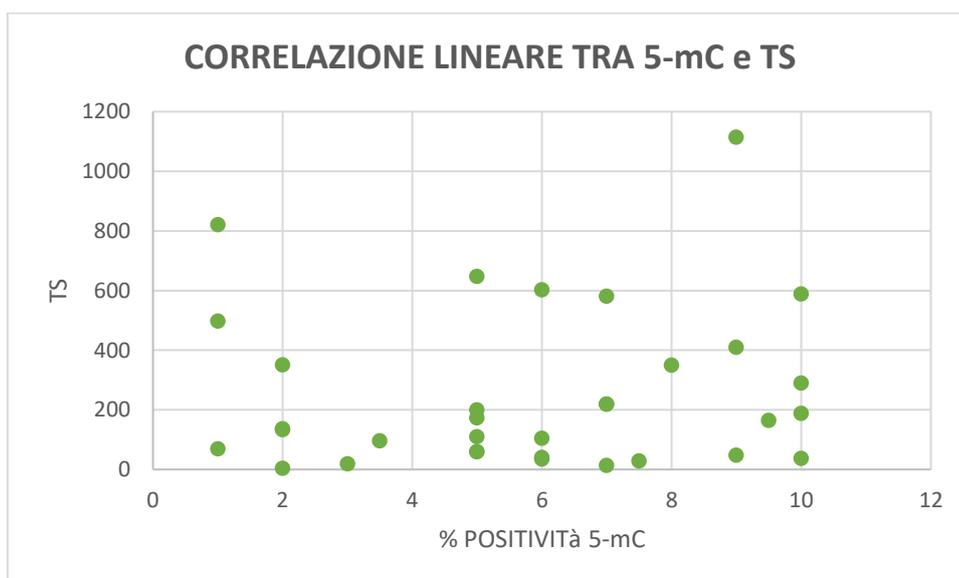


Fig. 36 Grafico correlazione lineare 5-mC e TS.

Pertanto, i risultati attesi, ossia ETBR e 5-mC maggiormente espressi nei tumori con tempo di sopravvivenza minore non sono statisticamente dimostrabili.

L'analisi statistica tramite test ANOVA e test di normalità ha dimostrato gli stessi risultati anche per la suddivisione in categorie di immunoreattività (*mild, moderate, severe*), ossia un'assenza di correlazione statisticamente significativa.

12 DISCUSSIONE

Nel presente studio è stata analizzata la possibilità di utilizzare il recettore di tipo B dell'endotelina (ETBR) e la 5-metilcitosina (5-mC) come fattori prognostici nel melanoma orale canino valutandone l'espressione immunoistochimica.

Come era già stato evidenziato nello studio precedente (2022) l'analisi statistica non ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa tra il tempo di sopravvivenza e la percentuale di positività all'immunoistochimica.

Uno dei limiti principali di questo studio è stata la raccolta anamnestica, in quanto nel database dell'ospedale veterinario (HCV) i casi di melanoma orale canino riportati erano inizialmente 47, ma soltanto di 11 campioni è stato possibile ottenere le informazioni necessarie per l'esecuzione delle analisi immunoistochimiche, ossia il tempo di sopravvivenza, inteso come tempo trascorso tra la diagnosi del melanoma orale e la morte dell'animale.

Questo studio è stato svolto cercando di colmare uno dei limiti del lavoro precedente del 2022, ossia il numero limitato di casi (22). Nonostante l'aggiunta di 11 campioni di melanoma orale canino, si presume che il numero sia risultato ancora troppo limitato per ottenere delle correlazioni statisticamente significative. Quello che ci si aspettava dallo studio era una maggiore espressione immunoistochimica di ETBR e 5-mC nei melanomi orali con un ridotto tempo di sopravvivenza, e di conseguenza con una maggiore malignità, correlazione possibilmente dimostrabile statisticamente.

Tutti i 33 campioni sono stati analizzati in due modi, sia tramite la suddivisione in categorie (*mild*, *moderate* e *severe*) sulla base della loro positività all'immunoistochimica, sia sulla percentuale di immunoreattività senza categorizzazione. La scelta di questa doppia analisi è stata basata sul fatto che, nel precedente studio, i campioni erano stati solo suddivisi in categorie non producendo risultati statisticamente significativi.

Infatti, il maggior limite delle categorie è la ridotta numerosità campionaria per ognuna. Pertanto, per questo studio, è stato scelto di procedere con due analisi statistiche parallele per valutare eventuali differenze statistiche nei risultati, che, tuttavia, non sono state osservate.

Inoltre, la determinazione della percentuale di cellule neoplastiche positive all'immunohistochimica è stata eseguita tramite metodo semiquantitativo al microscopio ottico, possibile ulteriore limite dello studio. Tale valutazione non è stata totalmente oggettiva, quindi potrebbe mancare una ripetibilità assoluta dei risultati in base alla persona responsabile dell'osservazione microscopica. Sicuramente l'utilizzo di un sistema automatizzato di analisi dell'immagine renderebbe la valutazione più oggettiva e attendibile.

Sicuramente il dato emerso è che il MOC esprime sia ETBR che 5-mC. Dal nostro studio è stato osservato che l'immunoreattività era a livello nucleare per 5-mC, mentre per ETBR è stata osservata anche a livello di membrana, citoplasmatica ad aspetto granulare, ma anche nucleare.

In riferimento alla tabella riassuntiva dei risultati (figura 31), soltanto 10 campioni su 33 manifestavano un livello di positività superiore al 60% per entrambi gli anticorpi, mentre diversi campioni presentavano un'elevata percentuale solo per uno dei due. Solo un caso ha avuto una positività del 100% sia per 5-mC che per ETBR.

Non è ancora chiaro come valutare la ridotta positività a 5-mC, in quanto in letteratura alcuni studi (Daniel et al., 2011; Ishizaki et al., 2020) evidenziano anche la correlazione tra un'elevata ipometilazione e una maggiore aggressività del tumore.

Facendo riferimento invece ai risultati suddivisi in categorie (figura 30), per 5-mC la categoria maggiormente rappresentata era la *severe* (ossia con una positività > 66%), mentre per ETBR la *moderate* (34-66%).

La letteratura scientifica consultata esprime pareri comuni riguardo l'espressione di ETBR e il suo coinvolgimento nell'angiogenesi tumorale, dimostrando come un suo aumento conduca a una maggiore produzione di fattori di crescita endoteliale (VEGF) e di conseguenza dia al tumore la possibilità di sviluppare nuovi vasi, a partire da quelli esistenti, funzione indispensabile per il suo sviluppo e la sua diffusione (Bagnato et al., 2011; Saldana-Caboverde & Kos, 2010)

Questo dato è stato confermato anche dallo studio di Saldana-Caboverde & Kos (2010) che ha messo in evidenza la correlazione tra l'aggressività del fenotipo di melanoma e l'aumento dell'espressione di ETBR. Mentre, lo studio di Said & Theodorescu (2012) mette in evidenza

come il blocco del sito di legame di ETBR e della catena che innesca porterebbe alla conseguente riduzione dell'angiogenesi tumorale.

Per quanto riguarda la metilazione del DNA non è ancora chiaro se la maggiore aggressività del MOC sia data da una condizione di ipometilazione o ipermetilazione.

Come è evidenziato nello studio di Moore et al. (2013) l'aggiunta di gruppi metili causa una soppressione del gene coinvolto, specialmente a livello delle isole CpG che si trovano nelle regioni regolatrici degli oncosoppressori, come p53. Queste isole normalmente non sono metilate, quindi una loro metilazione causa un silenziamento dell'espressione genica (Gibney & Nolan, 2010; Moore et al., 2013). Al contrario, nei tumori è stata osservata anche la condizione opposta, ossia un'ipometilazione che, come evidenziato dallo studio di Ishizaki et al. (2020), facilita l'instabilità cromosomica. Inoltre, come riportato anche dallo studio condotto da Daniel et al. (2011), una scarsa metilazione consente l'espressione di un numero superiore di oncogeni che solitamente sarebbero silenziati; quindi, di conseguenza producono un comportamento tumorale più aggressivo. Nello studio condotto da Scattone et al. (2021), in cui è stato quantificato il grado di metilazione del DNA nei linfociti circolanti nei casi di melanoma orale amelanotico e melanotico, l'ipometilazione è stata riportata come pattern predominante, senza però evidenziare differenze tra melanoma melanotico e amelanotico, quest'ultimo generalmente ritenuto più aggressivo.

Uno dei limiti maggiori dello studio è stata la difficoltà nella raccolta dei dati inerenti che, spesso, può essere parziale ed incompleta poiché i proprietari si affidano a strutture diverse. Gli stessi proprietari possono decidere di non eseguire l'esame istologico per identificare la neoplasia, o accorgersi tardivamente della presenza della massa a livello orale. In aggiunta, spesso la diagnosi di MOC è più tardiva rispetto alla reale insorgenza della neoplasia proprio perché i proprietari hanno la possibilità di cambiare struttura veterinaria, così facendo può non avvenire correttamente il passaggio di informazioni tra una struttura e l'altra. La diagnosi può essere ulteriormente ostacolata dalla scelta del proprietario di eseguire l'eutanasia, in caso di una condizione clinica fortemente compromessa, prima di un eventuale esame istologico e di conseguenza di identificare la neoplasia.

Un altro fattore da considerare è stata la policy interna dell'HCV, che non concede generalmente agli studenti di contattare i proprietari e quindi di ottenere maggiori informazioni per quei casi in cui nelle cartelle cliniche non era specificata la data di diagnosi del tumore o la data di decesso del cane, conducendo così all'esclusione di diversi casi e riducendo la possibilità di ampliare il numero di campioni raccolti.

Il nostro studio potrebbe risultare utile nella pratica veterinaria quotidiana in quanto in letteratura non esistono ancora dei markers immunoistochimici prognostici del melanoma orale canino, che come citato da Bergman (2007) è la neoplasia più comune nel cavo orale, rappresentando il 7% di tutti i tumori maligni del cane, secondo Segoula et al. (2018).

Quindi sarebbe interessante avere dei test diagnostici ad uso clinico in grado di dare informazioni sulla prognosi del melanoma orale canino, specialmente data la sua aggressività e il suo alto tasso di metastasi (Bowl Blacklock et al., 2019).

Attualmente la prognosi si basa sullo studio di Smedley et al. (2022), che combina la valutazione complessiva su diversi fattori, quali localizzazione, età, stadio, dimensioni, invasione ossea, valutazione istologica (indice mitotico e atipia nucleare) e valutazione immunoistochimica (Ki67). Inoltre, il MOC si presenta spesso anche in forma amelanotica, talvolta scarsamente differenziabile da altre forme tumorali.

Nonostante non presenti fattori di rischio dimostrati (Nishiya et al., 2016; Bergman et al., 2012), il MOC è stato osservato con maggiore frequenza in alcune razze canine, tra cui il Golden Retriever, Scottish Terrier, Labrador Retriever, Barbone, Bassotto e Chow Chow (Bergman et al., 2012; Murphy et al., 2019). Pertanto, in caso di riscontro di neoplasia orale in una di queste razze ed in soggetti di età avanzata (intorno agli 11 anni) si può porre, tra le diagnosi differenziali, il melanoma orale canino al primo posto.

13 CONCLUSIONI

Nonostante i risultati ottenuti nel seguente studio non abbiano prodotto un esito statisticamente significativo, questo lavoro può essere utilizzato come base per poter approfondire ulteriormente l'espressione di ETBR e 5-mC come fattori prognostici del melanoma orale canino. Poiché la letteratura riporta tali marker associati alla malignità del tumore (Daniel et al., 2011; Said & Theodorescu, 2012) e data l'elevata frequenza del melanoma orale nel cane, sarebbe utile proseguire, con ulteriori studi futuri, l'indagine immunohistochimica, colmando le difficoltà incontrate nel presente lavoro.

Ampliare il numero di casi è sicuramente il punto da cui partire per rendere lo studio più solido dal punto di vista statistico. Considerate le difficoltà nell'ottenimento del follow-up in medicina veterinaria, si potrebbe pensare di coinvolgere anche altre università italiane ed europee per creare una rete di condivisione dei propri casi ed agevolare l'acquisizione dei dati necessari.

Un altro aspetto che può essere migliorato è la valutazione microscopica dei campioni in modo tale da renderla più oggettiva, scegliere di usare sistemi automatizzati di acquisizione dell'immagine aumenterà la precisione delle informazioni da ottenere.

In conclusione, lo scopo futuro è di affiancare ai fattori prognostici del MOC, ora basata principalmente sull'atipia nucleare, sull'indice mitotico e sulla valutazione del Ki67, un metodo immunohistochimico preciso, che potrà aiutare quotidianamente i medici veterinari nello svolgimento della professione e consentirà di scegliere il trattamento più idoneo in base allo stadio di sviluppo del tumore.

BIBLIOGRAFIA

- Adair TH, & Montani JP. (2010). Overview of Angiogenesis. In Morgan & Claypool Life Sciences (A c. Di), *Angiogenesis* .
- Alberto Camacho Vargas, S. (2017). *Estudio retrospectivo de neoplasias melanocíticas en caninos en el laboratorio de histopatología de la Universidad de La Salle*. <https://ciencia.lasalle.edu.co/>
- Bagnato, A., Loizidou, M., Pflug, B. R., Curwen, J., & Growcott, J. (2011). Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 163, Numero 2, pagg. 220–233). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01217.x>
- Baja, A. J., Kelsey, K. L., Ruslander, D. M., Gieger, T. L., & Nolan, M. W. (2022). A retrospective study of 101 dogs with oral melanoma treated with a weekly or biweekly 6 Gy × 6 radiotherapy protocol. *Veterinary and Comparative Oncology*, 20(3), 623–631. <https://doi.org/10.1111/vco.12815>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. In *Cell Research* (Vol. 21, Numero 3, pagg. 381–395). <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 3, Numero 6, pagg. 401–410). <https://doi.org/10.1038/nrc1093>
- Bergman, P. J. (2007). Canine Oral Melanoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 22(2), 55–60. <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2007.03.004>
- Bergman, P. J., Kent, M. S., & Farese, J. P. (2012). Melanoma. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology: Fifth Edition*, 321–334. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2362-5.00019-0>
- Biondi, L. R., Tedardi, M. V., Gentile, L. B., Chamas, P. P. C., & Dagli, M. L. Z. (2021). Quantification of Global DNA Methylation in Canine Mammary Gland Tumors via Immunostaining of 5-Methylcytosine: Histopathological and Clinical Correlations. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.628241>
- Boston, S. E., Lu, X., & Culp, W. T. N. (2014). Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001–2012). *AVMA Journals*, 245(4).
- Bowlt Blacklock, K. L., Birand, Z., Selmic, L. E., Nelissen, P., Murphy, S., Blackwood, L., Bass, J., McKay, J., Fox, R., Beaver, S., & Starkey, M. (2019). Genome-wide analysis of canine oral malignant melanoma metastasis-associated gene expression. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42839-x>

- Brocca, G., Ferrareso, S., Zamboni, C., Martinez-Merlo, E. M., Ferro, S., Goldschmidt, M. H., & Castagnaro, M. (2019). Array Comparative Genomic Hybridization Analysis Reveals Significantly Enriched Pathways in Canine Oral Melanoma. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01397>
- Buracco, P. (2018). *Melanoma maligno orale del cane*.
- Crusio, W. E., Dong, H., & Radeke, H. H. (2019). Volume 1283 Series Editors. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. <http://www.springer.com/series/5584>
- Daniel, F. I., Cherubini, K., Yurgel, L. S., De Figueiredo, M. A. Z., & Salum, F. G. (2011). The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. In *Cancer* (Vol. 117, Numero 4, pagg. 677–687). <https://doi.org/10.1002/cncr.25482>
- Dupont, C., Armant, D. R., & Brenner, C. A. (2009). Epigenetics: Definition, mechanisms and clinical perspective. In *Seminars in Reproductive Medicine* (Vol. 27, Numero 5, pagg. 351–357). <https://doi.org/10.1055/s-0029-1237423>
- Elliott, J. W., Cripps, P., Blackwood, L., Berlato, D., Murphy, S., & Grant, I. A. (2016). Canine oral mucosal mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14(1), 101–111. <https://doi.org/10.1111/vco.12071>
- Fonseca-Alves, C. E., Ferreira, Ê., de Oliveira Massoco, C., Strauss, B. E., Fávaro, W. J., Durán, N., Oyafuso da Cruz, N., dos Santos Cunha, S. C., Castro, J. L. C., Rangel, M. M. M., Brunner, C. H. M., Tellado, M., dos Anjos, D. S., Fernandes, S. C., Barbosa de Nardi, A., Biondi, L. R., & Dagli, M. L. Z. (2021). Current Status of Canine Melanoma Diagnosis and Therapy: Report From a Colloquium on Canine Melanoma Organized by ABROVET (Brazilian Association of Veterinary Oncology). *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.707025>
- Freeman, K. (2007). Veterinary Cytology. In *Veterinary Cytology*. <https://doi.org/10.1201/b15222>
- Gibney, E. R., & Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. In *Heredity* (Vol. 105, Numero 1, pagg. 4–13). <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.54>
- Grier, C. K., & Mayer, M. N. (2007). Oncology Corner Le coin de l'oncologie Radiation therapy of canine nontonsillar squamous cell carcinoma. In *CVJ* (Vol. 48).
- Grimes, J. A., Matz, B. M., Christopherson, P. W., Koehler, J. W., Cappelle, K. K., Hlusko, K. C., & Smith, A. (2017). Agreement Between Cytology and Histopathology for Regional Lymph Node Metastasis in Dogs With Melanocytic Neoplasms. *Veterinary Pathology*, 54(4), 579–587. <https://doi.org/10.1177/0300985817698209>
- Hardwick, L. (2021). A comparative view on molecular alterations and potential therapeutic strategies for canine oral melanoma. In *Veterinary Sciences* (Vol. 8, Numero 11). <https://doi.org/10.3390/vetsci8110286>

- Ishizaki, T., Yamazaki, J., Meagawa, S., Yokoyama, N., Aoshima, K., Takiguchi, M., & Kimura, T. (2020). Long interspersed nucleotide element-1 hypomethylation in canine malignant mucosal melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 18(4), 854–860. <https://doi.org/10.1111/vco.12591>
- Joly-Tonetti, N., Wibawa, J. I. D., Bell, M., & Tobin, D. (2016). Melanin fate in the human epidermis: a reassessment of how best to detect and analyse histologically. In *Experimental Dermatology* (Vol. 25, Numero 7, pagg. 501–504). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/exd.13016>
- Kim, W. S., Vinayak, A., & Powers, B. (2021). Comparative review of malignant melanoma and histologically well-differentiated melanocytic neoplasm in the oral cavity of dogs. In *Veterinary Sciences* (Vol. 8, Numero 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vetsci8110261>
- Knaake, F. A. C., & Verhaert, L. (2010). Histopathology and treatment of nine cats with multiple epulides. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*.
- Lai, C., & Healy, E. (2016). The Warthin–Starry stain for detection of cutaneous melanin: more than a historical curiosity. In *Experimental Dermatology* (Vol. 25, Numero 10, pagg. 763–764). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/exd.13101>
- Linden, D., Liptak, J. M., Vinayak, A., Grimes, J. A., Sandey, M., Smiley, W., & Matz, B. M. (2019). Outcomes and prognostic variables associated with primary abdominal visceral soft tissue sarcomas in dogs: A Veterinary Society of Surgical Oncology retrospective study. *Veterinary and Comparative Oncology*, 17(3), 265–270. <https://doi.org/10.1111/vco.12456>
- Lugano, R., Ramachandran, M., & Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 77, Numero 9, pagg. 1745–1770). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>
- Lüscher, T. F., & Barton, M. (2000). *Endothelins and Endothelin Receptor Antagonists Therapeutic Considerations for a Novel Class of Cardiovascular Drugs*. <http://www.circulationaha.org>
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An introduction to the performance of immunohistochemistry. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1897, pagg. 289–298). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
- Mechelli, L., & Lepri, E. (2004). *IL MASTOCITOMA NEL CANE E NEL GATTO: DIAGNOSI E PROGnosi* (Vol. 9, Numero 2).
- Meyer B., & Martin O. (2021). *Diagnosis and Treatment of Canine Oral Melanoma*. todaysveterinarypractice.com.
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 38, Numero 1, pagg. 23–38). <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

- Murphy, B. G., Bell, C. M., & Soukup, J. W. (2019a). Veterinary oral and maxillofacial pathology. In *Veterinary Oral and Maxillofacial Pathology*.
<https://doi.org/10.1002/9781119221296>
- Nemec, A., Murphy, B., Kass, P. H., & Verstraete, F. J. M. (2012). Histological Subtypes of Oral Non-tonsillar Squamous Cell Carcinoma in Dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 147(2–3), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.11.198>
- Nishiya, A. T., Massoco, C. O., Felizzola, C. R., Perlmann, E., Batschinski, K., Tedardi, M. V., Garcia, J. S., Mendonça, P. P., Teixeira, T. F., & Dagli, M. L. Z. (2016). Comparative aspects of canine melanoma. In *Veterinary Sciences* (Vol. 3, Numero 1). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
<https://doi.org/10.3390/vetsci3010007>
- Owen, L. N. , Ed. (1980). World Health Organization.TNM Classification of Tumours in Domestic Animal. *World Health Organization:Geneva, Switzerland,*.
- Palma, S. Di, McConnell, A., Verganti, S., & Starkey, M. (2021). Review on Canine Oral Melanoma: An Undervalued Authentic Genetic Model of Human Oral Melanoma? In *Veterinary Pathology* (Vol. 58, Numero 5, pagg. 881–889). SAGE Publications Inc.
<https://doi.org/10.1177/0300985821996658>
- Pazzi, P., Steenkamp, G., & Rixon, A. J. (2022). Treatment of Canine Oral Melanomas: A Critical Review of the Literature. In *Veterinary Sciences* (Vol. 9, Numero 5). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/vetsci9050196>
- Piras, L. A., Riccardo, F., Iussich, S., Maniscalco, L., Gattino, F., Martano, M., Morello, E., Lorda Mayayo, S., Rolih, V., Garavaglia, F., De Maria, R., Lardone, E., Collivignarelli, F., Mignacca, D., Giacobino, D., Ferrone, S., Cavallo, F., & Buracco, P. (2017). Prolongation of survival of dogs with oral malignant melanoma treated by en bloc surgical resection and adjuvant CSPG4-antigen electrovaccination. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(3), 996–1013. <https://doi.org/10.1111/vco.12239>
- Pires De Carvalho, J., Carrilho, M. C., Santos Dos Anjos, D., Dagli Hernandez, C., Sichero, L., Lúcia, M., & Dagli, Z. (2022). Unraveling the Risk Factors and Etiology of the Canine Oral Mucosal Melanoma: Results of an Epidemiological Questionnaire, Oral Microbiome Analysis and Investigation of Papillomavirus Infection. *Cancers*, 2022, 3397. <https://doi.org/10.3390/cancers>
- Poli A. (2004). Incidenza e classificazione dei tumori orali del cane e del gatto. *Quaderni di Odontostomatologia*, 2(1).
- Potente, M., Gerhardt, H., & Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. In *Cell* (Vol. 146, Numero 6, pagg. 873–887). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>
- Prouteau, A., & André, C. (2019). Canine melanomas as models for human melanomas: Clinical, histological, and genetic comparison. In *Genes* (Vol. 10, Numero 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes10070501>

- Prouteau, A., Chocteau, F., de Brito, C., Cadieu, E., Primot, A., Botherel, N., Degorce, F., Cornevin, L., Lagadic, M. A., Cabillic, F., de Fornel-Thibaud, P., Devauchelle, P., Derrien, T., Abadie, J., André, C., & Hédan, B. (2020). Prognostic value of somatic focal amplifications on chromosome 30 in canine oral melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, *18*(2), 214–223. <https://doi.org/10.1111/vco.12536>
- Przeździecki, R., Czopowicz, M., & Sapieryński, R. (2015). Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic melanomas in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, *44*(4), 597–604. <https://doi.org/10.1111/vcp.12292>
- Ramos-Vara, J. A., Beissenherz, M. E., Miller, M. A., Johnson, G. C., Pace, L. W., Fard, A., & Kottler, S. J. (2000). Retrospective Study of 338 Canine Oral Melanomas with Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Review of 129 Cases. In *Vet Pathol* (Vol. 37).
- Said, N., & Theodorescu, D. (2012). Permissive role of endothelin receptors in tumor metastasis. *Life Sciences*, *91*(13–14), 522–527. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.03.040>
- Saldana-Caboverde, A., & Kos, L. (2010). Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma. In *Pigment Cell and Melanoma Research* (Vol. 23, Numero 2, pagg. 160–170). <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00678.x>
- Scattono, N. V., Epiphonio, T. M. F., Caddrobi, K. G., Ferrão, J. S. P., Hernandez-Blazquez, F. J., Loureiro, A. P. de M., Massoco, C. de O., & Dagli, M. L. Z. (2021). Quantification of Global DNA Methylation in Canine Melanotic and Amelanotic Oral Mucosal Melanomas and Peripheral Blood Leukocytes From the Same Patients With OMM: First Study. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.680181>
- Segaoula, Z., Primot, A., Lepretre, F., Hedan, B., Bouchaert, E., Minier, K., Marescaux, L., Serres, F., Galiègue-Zouitina, S., André, C., Quesnel, B., Thuru, X., & Tierny, D. (2018). Isolation and characterization of two canine melanoma cell lines: New models for comparative oncology. *BMC Cancer*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5114-y>
- Sharkey, L. C., Radin, M. J., & Seelig, D. (2021). *Veterinary cytology* (2021^a ed.).
- Shataer, M., Shataer, S., Libin, L., Tian, L., & Shengbin, B. (2020). Histological comparison of two special methods of staining melanin in human skin. *International Journal of Morphology*, *38*(6), 1535–1538. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022020000601535>
- Smedley, R. C., Sebastian, K., & Kiupel, M. (2022). Diagnosis and Prognosis of Canine Melanocytic Neoplasms. In *Veterinary Sciences* (Vol. 9, Numero 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vetsci9040175>

- Tani, H., Miyamoto, R., Noguchi, S., Kurita, S., Nagashima, T., Michishita, M., Yayoshi, N., Tamura, K., & Bonkobara, M. (2021). A canine case of malignant melanoma carrying a KIT c.1725_1733del mutation treated with toceranib: a case report and in vitro analysis. *BMC Veterinary Research*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02864-3>
- Taufiqul Arif, K. M., Elliot, E. K., Haupt, L. M., & Griffiths, L. R. (2020). Regulatory mechanisms of epigenetic mirna relationships in human cancer and potential as therapeutic targets. In *Cancers* (Vol. 12, Numero 10, pagg. 1–26). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12102922>
- Tsoi, M. F., Thaiwong, T., Smedley, R. C., Noland, E., & Kiupel, M. (2021). Quantitative Expression of TYR, CD34, and CALD1 Discriminates Between Canine Oral Malignant Melanomas and Soft Tissue Sarcomas. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.701457>
- Tuohy Joanne L., D., Selmic Laura E., Bv. M., Ehrhart Nicole P., V. M., Withrow Stephen J., D., & Worley Deanna R., D. (2014). Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998–2011). *Journal of the American Veterinary Medical Association*.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio in primis il professor Antonio Jose Ramis Salva e la dottoressa Barbara Serrano, dell'Universitat Autònoma de Barcelona, per aver scelto di prendere parte a questo progetto dimostrando fin dall'inizio grande passione ed estrema disponibilità nei miei confronti.

Ringrazio in modo particolare il professor Massimo Castagnaro per la collaborazione e l'aiuto che mi ha dato nella stesura della tesi e per gli insegnamenti trasmessi durante il corso di laurea.

Un sentito ringraziamento va alla dottoressa Marta Giacomazzo che mi ha accompagnata, aiutata e supportata durante l'intero progetto con estrema gentilezza e pazienza.

Infine, desidero ringraziare l'intero Laboratorio di Anatomia Patologica, e in particolare il dottor Enrico Gallo, per avermi assistita nello svolgimento delle attività di laboratorio trasmettendomi le sue conoscenze e la sua passione.