

# INTEGRAZIONE DI PARAMETRI CLINICI ED ISTOLOGICI NELLA PROGNOSI DEI TUMORI MAMMARI MALIGNI DELLA CAGNA E DELLA GATTA

**G. SARLI\*, C. BENAZZI\*, M. GALEOTTI\*\*, O. CAPITANI\*\*\*, R. PREZIOSI\*, D. BERTON\*\*, P.S. MARCATO\***

*\*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bologna*

*\*\*Dipartimento di Scienze della Produzione Animale - Sezione di Biologia e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Udine*

*\*\*\*Istituto di Patologia e Igiene Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Padova*

## Riassunto

È stata valutata con analisi uniparametrica e multiparametrica, su una casistica di 115 cagne e 54 gatte con tumore mammario maligno M0, l'importanza sulla sopravvivenza a due anni post-mastectomia della dimensione del tumore (accertato su base clinica), del coinvolgimento linfonodale (accertato su base istologica) e di tipiche variabili di istoprognosi del tumore, quali il tipo di invasione, la differenziazione tubulo-ghiandolare e la presenza di proliferazione mioepiteliale (solo cagna).

Anche se la differenziazione tubulo-ghiandolare (nella cagna e non nella gatta) e la presenza di proliferazione mioepiteliale si sono rivelate significativamente associate alla sopravvivenza, esse perdono di importanza prognostica quando si dispone della dimensione del tumore, del coinvolgimento linfonodale e del tipo di invasione. Queste ultime tre variabili, risultate ciascuna significativamente associata alla sopravvivenza, si sono rivelate tra loro indipendenti in analisi multiparametrica. L'interessamento linfonodale nella cagna e il tipo di invasione nella gatta sono risultati i parametri più forti nel condizionare la sopravvivenza post-operatoria. In base ai risultati di sopravvivenza nei diversi gruppi, vengono proposti criteri di selezione per i soggetti da sottoporre a chemioterapia adiuvante.

## Summary

*A number of 115 bitches and 54 queens bearing M0 malignant mammary tumours was studied to assess the importance on survival of tumour size (clinically ascertained), lymph node involvement (histologically diagnosed), and typical variables of histological prognosis of the neoplasms such as: type of invasion, tubulo-glandular differentiation, and the presence of myoepithelial proliferation (only in the dog).*

*The assessment was performed using data obtained from uniparametric and multiparametric analyses. Significantly associated to survival resulted to be the tubulo-glandular differentiation (in the bitch, not in the queen) and the presence of myoepithelial proliferation, even though they lose their prognostic importance when the size of the tumour, lymph node involvement and type of invasion are known. Each of these three variables revealed significantly associated to survival, and independent on the others in the multiparametric analysis. The lymph node involvement for the bitch and the type of invasion for the queen revealed to be the parameters with the strongest influence on the post-surgical outcome. On the basis of the survival data for the different groups, selection criteria are proposed for the subjects to expose to adjuvant chemotherapy.*

## INTRODUZIONE

La letteratura sui tumori mammari della cagna e della gatta è ampia sia per quanto riguarda i criteri di classificazione e grading<sup>13, 14, 18, 20, 28, 40</sup>, sia per le analogie con il cancro al seno della donna che li propongono come modello animale spontaneo di malattia umana<sup>24, 25, 26, 38, 41</sup>. Inoltre, negli anni recenti, si sono considerati gli aspetti prognostici della patologia neoplastica in base a variabili d'ordine clinico o istologico (vedi bibliografia 35), a dati di cinetica tumorale<sup>8, 9, 32, 34</sup> e di citogenetica oncologica<sup>3, 22, 23</sup>.

Concetti ormai considerati conclusivi sui tumori mammari delle due specie in esame sono:

- una maggiore frequenza delle neoplasie maligne nella gatta (rapporto benigni/maligni fino a 1/9) rispetto alla cagna (rapporto benigni/maligni 4/6)<sup>21</sup>;
- il considerare i tumori mammari di entrambe le specie come accreditati modelli di malattia umana, soprattutto in relazione alla spontaneità di insorgenza, con rischio però maggiore nella gatta (fino a 7 volte)<sup>25</sup> o nella cagna (fino a 3 volte)<sup>38</sup> rispetto alla donna, all'interessamento pressoché esclusivo del sesso femminile<sup>25, 38</sup>, all'importanza degli ormoni steroidei nell'eziologia<sup>38</sup> e alla tendenza alla diffusione metastatica (soprattutto la gatta)<sup>25</sup>;
- la validità di applicazione a fini prognostici di variabili d'ordine clinico, tra le quali le più accreditate sono la dimensione e la mobilità della neoplasia, e di ordine istologico, le più importanti delle quali sono il grado e lo stadio istologico;
- la dimostrazione che, nei tumori maligni, parallelamente all'aumento della quota proliferante, si registra un più ridotto tempo di sopravvivenza post-mastectomia.

Restano invece poco definiti altri aspetti di ordine clinico: l'utilità di mastectomie radicali rispetto a quelle più conservative, peraltro ritenuta non convincente nel cane<sup>1, 27, 42, 43</sup> rispetto al gatto<sup>19</sup> e gli effetti della ormonoterapia e della chemioterapia, risultati inferiori a quelli ottenuti sulla donna, considerato anche il minor numero di animali trattati.

Pur essendo noti da tempo diversi sistemi di grading clinico<sup>24, 29</sup> o istologico<sup>13, 20, 18, 40</sup> delle neoplasie mammarie, risultano scarse le informazioni a fini prognostici che possono derivare dall'integrazione dei sistemi o delle variabili in essi contenute. Inoltre, pur essendo ritenuta scarsa l'utilità della mastectomia, da sola, nel prevenire le recidive e/o le metastasi, neppure i più recenti trattati di clinica oncologica<sup>27, 42, 43</sup> definiscono i criteri per scegliere i soggetti da sottoporre a terapie adiuvanti al fine di non adottare la chemioterapia "alla cieca", solo in base al responso dell'esame istologico di neoplasia maligna.

Da alcuni anni le nostre strutture attuano un programma di raccolta dati di sopravvivenza post-mastectomia di cagne e gatte operate di tumore mammario risultato maligno all'esame istologico. Nel presente lavoro abbiamo svolto un'indagine tesa a:

- valutare a fini prognostici l'informazione integrata derivante da due parametri assodati di graduazione delle neoplasie mammarie, uno clinico (la dimensione) e l'altro istologico (il grado di invasione o stadio istologico);

- valutare, in gruppi di soggetti definiti in base ai criteri del punto precedente, ma soprattutto in base ad una modifica dello stadio istologico proposto da Gilbertson e coll. (1983), in quali gruppi la mastectomia si può considerare sufficientemente protettiva ai fini della sopravvivenza a 2 anni post-mastectomia ed in quali, invece, potrebbe essere utile un intervento di chemio/ormono terapia adiuvante.

## MATERIALI E METODI

### Selezione dei casi

Tra i casi presenti nel database in nostra dotazione sono stati scelti quelli che corrispondevano ai seguenti criteri:

- diagnosi istologica di neoplasia maligna;
- negatività pre-mastectomia per metastasi mediante accertamento radiografico (torace) ed ecografico (fegato, reni);
- censimento a controlli periodici trimestrali per un periodo di 24 mesi post-mastectomia.

In base a tali criteri si sono selezionati 54 casi per la gatta e 115 casi per la cagna.

### Criteri di graduazione

- In 83 casi della cagna ed in 32 casi della gatta era nota la dimensione del tumore per cui i casi sono stati graduati in T1, T2 e T3 secondo il protocollo della stadiazione TNM proposto da Owen (1980). Più precisamente nella gatta T1 corrisponde a neoplasie con diametro massimo inferiore ad 1 cm, T2 tra 1 e 3 cm e T3 con diametro massimo superiore a 3 cm; nella cagna T1 con diametro massimo inferiore a 3 cm, T2 tra 3 e 5 cm e T3 con diametro massimo superiore a 5 cm. Per tutti i casi era anche noto, mediante accertamento su base istologica, il coinvolgimento o meno del linfonodo regionale.
- Tutti i casi sono stati graduati istologicamente per l'invasività secondo Gilbertson e coll. (1983), il cui criterio, proposto per il cane, è stato poi esteso anche alla gatta da Mandelli e coll. (1987). La graduazione istologica è stata condotta su sezioni istologiche, colorate con ematossilina-eosina, di materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina. Ai fini della valutazione dell'invasività, le sezioni contenevano o l'intero diametro della neoplasia più il tessuto circostante (in caso di piccole dimensioni) o una sezione condotta al limite tra neoplasia e tessuto circostante. Sono così stati definiti 3 gruppi:
  - stadio istologico 0 o tumore maligno non infiltrante, quando la proliferazione neoplastica non appariva superare la membrana basale (Fig. 1);
  - stadio istologico I o tumore maligno infiltrante con invasione stromale (cioè superamento della membrana basale ed invasione dello stroma);
  - stadio istologico II o tumore maligno infiltrante con emboli nei vasi linfatici o ematici e/o metastasi al linfonodo regionale (inguinale superficiale o ascellare ipsilaterale).



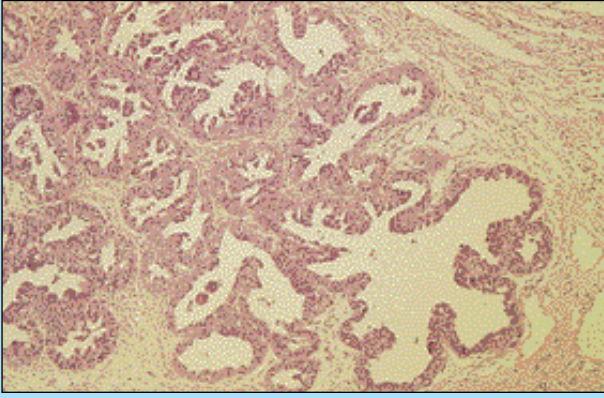


FIGURA 1 - Gatta. Adenocarcinoma papillare. Proliferazione epiteliale, neoplastica, maligna che non ha ancora invaso il tessuto connettivo periduttulare. Stadio istologico 0 o tumore maligno non infiltrante.

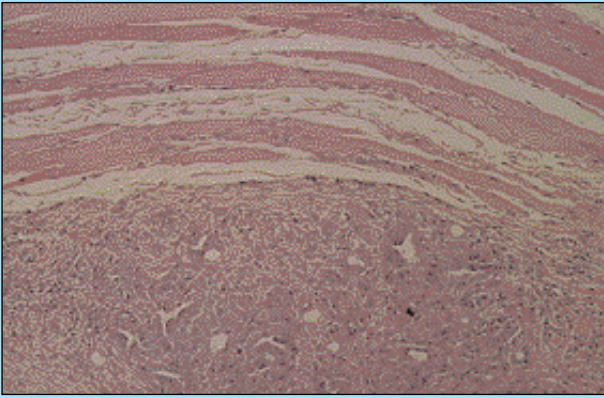


FIGURA 2 - Gatta. Adenocarcinoma tubulare. Al limite tra tumore e tessuto circostante (parete muscolare) è presente una sottile capsula che non appare superata dal processo neoplastico. Cellule tumorali si rinvengono, però, nel tessuto connettivo intracapsulare. Stadio istologico I con invasione intracapsulare.

- c) I casi a stadio istologico I sono stati, secondo un criterio da noi proposto, ulteriormente suddivisi in:
- stadio I con invasione intracapsulare: quelli in cui era presente una capsula non invasa e/o superata dalle cellule neoplastiche, però risultava superata la membrana basale dell'epitelio neoplastico e il processo di invasione si svolgeva all'interno dello stroma intracapsulare (Figg. 2 e 3);
  - stadio I con invasione extracapsulare: quelli in cui la capsula o non era presente o, se presente, si apprezzava invasa e/o superata dalle cellule neoplastiche, ed il processo invasivo si svolgeva nei tessuti circostanti il tumore (mammella circostante, piani muscolari della parete toraco-addominale, sottocute sovrastante la neoplasia) (Fig. 4).
- d) I casi a stadio istologico II sono stati, sempre secondo un criterio da noi proposto, ulteriormente suddivisi in:
- stadio II con rari vasi linfatici o ematici presentanti emboli neoplastici (quando si rilevavano cellule neoplastiche nei vasi ematici o linfatici) (Fig. 5);

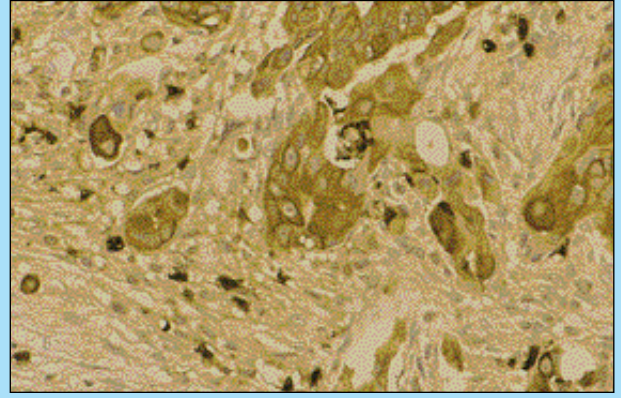


FIGURA 3 - Gatta. Adenocarcinoma tubulare con invasione dello stroma intracapsulare. Le cellule carcinomatose sono colorate in marrone da una reazione immunoistochimica per l'anticorpo policlonale anti-pancheratina. L'immagine, seppure non corrisponde ad una metodica impiegata nel presente lavoro, ha lo scopo di rendere più chiaro al lettore il concetto di invasione dello stroma intracapsulare: nel campo sono visibili singole cellule neoplastiche con citoplasma intensamente colorato in marrone, che hanno il significato di cellule neoplastiche infiltranti lo stroma tumorale.

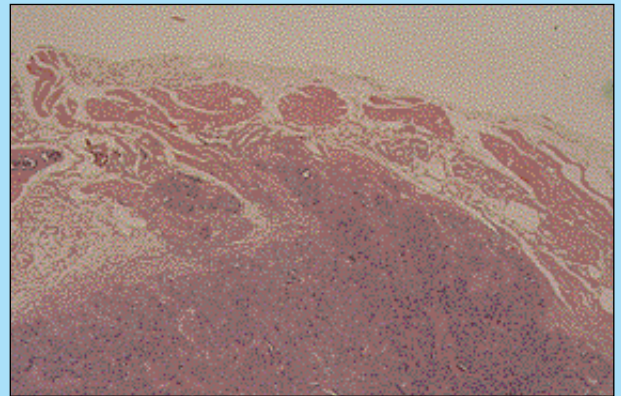


FIGURA 4 - Gatta. Adenocarcinoma tubulare. La proliferazione neoplastica ha superato la capsula ed ha invaso il tessuto circostante, nel campo rappresentato dai muscoli scheletrici della parete addominale. Stadio istologico I con invasione extracapsulare.

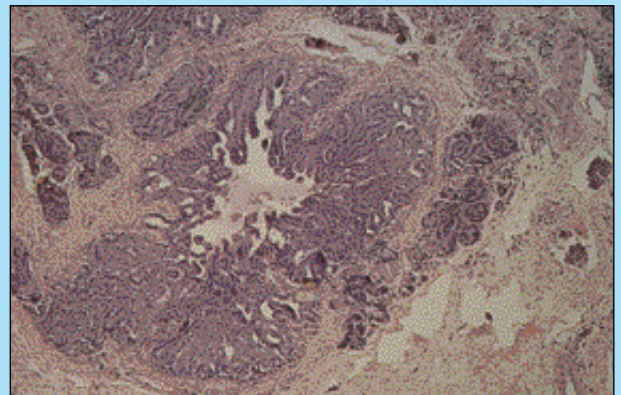
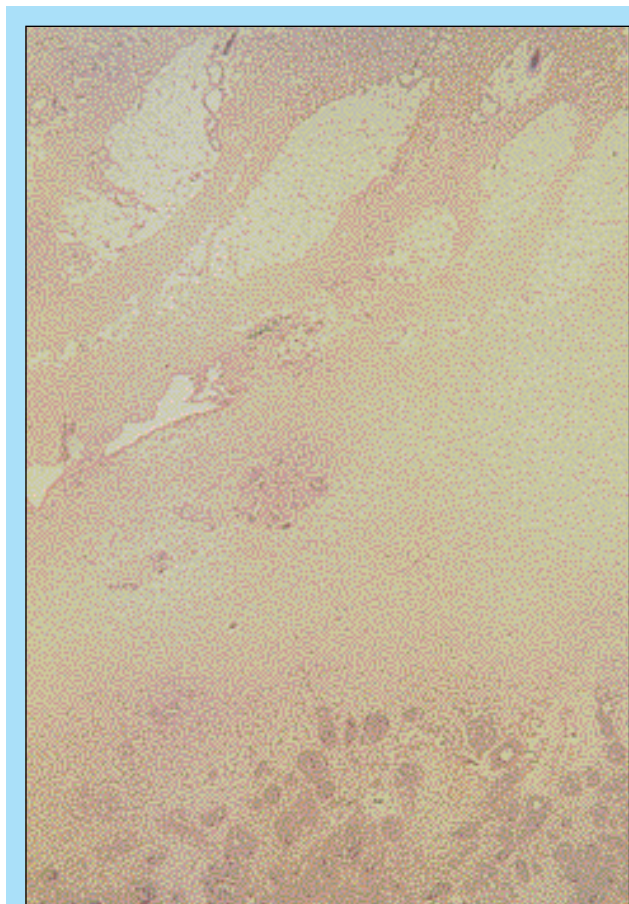


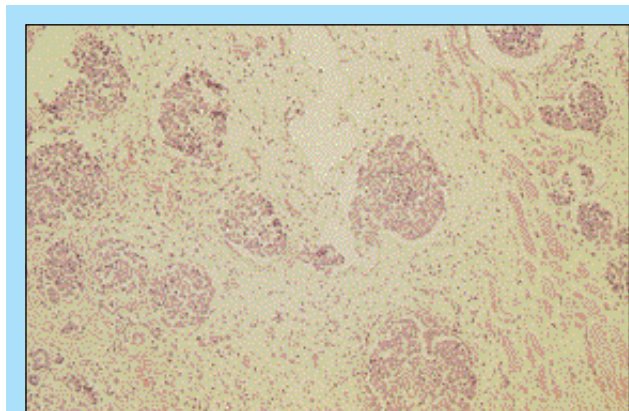
FIGURA 5 - Cane. Adenocarcinoma papillare. Nel campo, a destra, sono presenti emboli neoplastici endovasali. Stadio istologico II.



- stadio II con massiva embolia dei vasi linfatici (quando si rilevavano più di due vasi linfatici con emboli neoplastici in un campo a 25x e l'osservazione era ripetibile in almeno il 25% del tessuto peritumorale sottocutaneo) (Figg. 6 e 7). Questi ultimi casi saranno riferiti di seguito come "carcinoma infiammatorio" per l'analogia con la denominazione in campo umano.



**FIGURA 6 - Cane.** Tessuto sottocutaneo con edema e, nella parte inferiore del campo, vasi linfatici con emboli neoplastici (vedi particolare di questa zona nella figura 7). Il soggetto aveva un carcinoma anaplastico della II mammella toracica sinistra. Stadio istologico II con l'aspetto del carcinoma infiammatorio.



**FIGURA 7 - Cane.** Particolare della Figura 6. Massiva invasione dei vasi linfatici del derma. Stadio istologico II con l'aspetto del carcinoma infiammatorio.

- e) Ai fini della proliferazione mioepiteliale i casi sono stati suddivisi in:
  - presente come nei c.d. tumori complessi e misti della classificazione di Hampe e Misdorp (1974) e di Moulton (1990);
  - assente (c.d. forme semplici della classificazione di Hampe e Misdorp, 1974).
- f) Ai fini della differenziazione tubulo-ghiandolare i casi sono stati suddivisi in:
  - differenziazione tubulo-ghiandolare presente (quando una struttura riconducibile a tubuli o acini era rilevabile in più del 50% del tessuto tumorale esaminato);
  - differenziazione tubulo-ghiandolare assente (quando una struttura riconducibile a tubuli o acini non era rilevabile in più del 50% del tessuto tumorale esaminato).

## Analisi statistica

La sopravvivenza post-mastectomia dei gruppi definiti in base alla dimensione, al coinvolgimento linfonodale o all'invasività è stata confrontata con l'analisi di sopravvivenza. Per 29 casi della cagna in cui il database conteneva anche il controllo trimestrale radiografico (torace) ed ecografico (fegato, reni) per escludere l'eventuale presenza di metastasi, l'analisi di sopravvivenza è stata applicata non solo ai fini della sopravvivenza globale (tempo tra la mastectomia e la morte spontanea o da eutanasia per la neoplasia) ma anche per l'intervallo libero da cancro (tempo tra la mastectomia e la recidiva locale o la metastasi). La relazione tra la dimensione e l'invasività è stata definita mediante test di Spearman, mentre la relazione tra variabili singolarmente risultate significativamente associate alla prognosi è stata definita mediante analisi multiparametrica. Per tutti i test un valore di P inferiore a 0,05 è stato considerato significativo.

## RISULTATI

### Cane

In Tabella 1 sono riassunti i dati (numero di casi, sopravvivenza media e deviazione standard per gruppo, percentuale di casi censiti a 24 mesi per gruppo, valore di P dell'analisi di sopravvivenza) riferiti alla sopravvivenza, mentre in tabella 2 sono riassunti quelli (numero di casi, sopravvivenza media e deviazione standard per gruppo, percentuale di casi non recidivati a 24 mesi per gruppo, valore di P dell'analisi di sopravvivenza) riferiti all'intervallo libero da cancro.

Nel cane, confrontando i 3 gruppi contemporaneamente, la dimensione del tumore è risultata significativamente associata alla sopravvivenza. Scomponendo i confronti, i tumori T1 (diametro inferiore a 3 cm) si sono rivelati prognosticamente più favorevoli rispetto ai T2 (diametro tra 3 e 5 cm) o ai T3 (diametro superiore a 5 cm), mentre la differenza di sopravvivenza tra T2 e T3 non è risultata statisticamente significativa (Graf. 1). L'interessamento linfonodale, definito su base istologica, si è rivelato significati-

Tabella 1

**Cagna. Numerosità dei gruppi, sopravvivenza globale media e deviazione standard per gruppo, percentuale di sopravvissuti a 24 mesi post-mastectomia per gruppo, e confronto con l'analisi di sopravvivenza in 115 cagne portatrici di tumore mammario maligno, con T noto in 83 casi.**  
 (\*confronto contemporaneo di tutti e tre i T; \*confronto contemporaneo di tutti e tre gli stadi istologici 0, I e II)

	Numero casi	Sopravvivenza in mesi (media±dev.st)	% censiti a 24 mesi	Analisi di sopravvivenza
<b>Casi con T noto</b>	83	20,21±7,49	75	°P<0,05
T1	41	22,73±4,84	81	T1 vs T2 P<0,05
T2	19	19,68±7,58	58	T1 vs T3 P<0,01
T3	23	16,17±9,51	61	T2 vs T3 P=0,153
Lfn. negativi	63	23,09±3,68	84	} P<0,01
Lfn. positivi	20	11,15±9,16	25	
<b>Casi con sopravvivenza nota</b>	115	20,52±7,10	76	*P<0,01
Stadio istologico 0	24	>24	100	St0 vs StI P=0,33
Stadio istologico I	66	22,86±3,87	86	St0 vs StII P<0,01
Stadio istologico II	25	11,01±8,81	26	StI vs StII P<0,01
Stadio istologico I				} P=0,36
intracapsulare	31	23,67±1,04	90	
extracapsulare	35	22,14±5,15	91	
Stadio istologico II				} P<0,05
rari emboli	16	14,01±9,33	33	
massiva embolia	9	5,66±4,41	0	
Diff. tubulo-ghiandolare				} P=0,01
presente	62	22,04±5,35	85	
assente	53	18,59±8,49	51	
Proliferaz. mioepiteliale				} P<0,05
assente	76	19,70±7,80	61	
presente	39	21,94±5,44	87	

vamente associato alla prognosi. Poiché la dimensione del tumore, mediante il test di correlazione di Spearman, si è rivelata significativamente, ma modicamente, associata al coinvolgimento linfonodale ( $P<0,01$ ,  $R=0,31$ ) si è proceduto a valutare se nell'ambito di ogni T preso singolarmente l'interessamento linfonodale potesse fornire indicazioni sulla sopravvivenza, a parità di T. Sia in T1, che in T2 o T3 (grafico 1 riquadro) l'analisi di sopravvivenza ha messo in evidenza curve di Kaplan&Meier significativamente diverse tra i due gruppi a confronto (Tab. 4). La dimensione del tumore ha mostrato anche una significativa, ma debole, associazione con lo stadio istologico (test di Spearman  $P<0,01$ ,  $R=0,40$ ).

Utilizzando i 115 casi a nostra disposizione, lo stadio istologico si è rivelato sufficientemente predittivo della sopravvivenza post operatoria. L'analisi di sopravvivenza ha permesso di rilevare che la differenza si registra nello stadio II confrontato con quello 0 o I, ma non tra questi ultimi due (Graf. 2). Tra stadio istologico I e II si è registrata anche una differenza statisticamente significativa nell'intervallo libero da cancro (Graf. 3), utilizzando i 29 casi in cui esso era disponibile. La suddivisione dello stadio I in casi con invasione intracapsulare ed extracapsulare non ha fatto rilevare differenze nelle curve di sopravvivenza dei gruppi (Tab. 1), ma nell'intervallo libero da can-

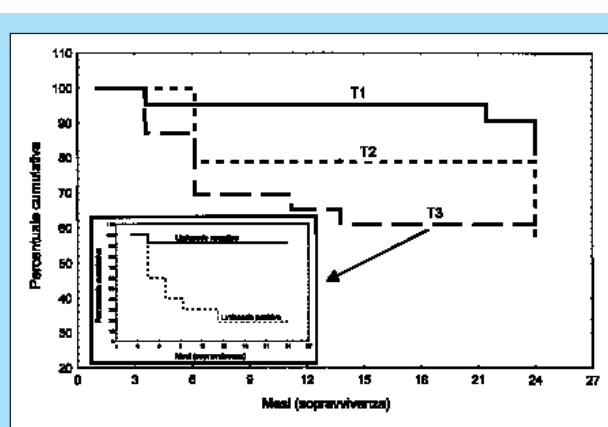


GRAFICO 1 - Cane. Curve di Kaplan&Meier nei tre gruppi gruppi T1, T2 e T3 e, nel riquadro, del solo gruppo T3 suddiviso in base al coinvolgimento o meno del linfonodo regionale. Per la numerosità dei gruppi ed il confronto statistico si vedano le Tabelle 1 e 4.

cro, cioè la recidiva locale o a distanza (metastasi) compare con un significativo anticipo negli stadi I con invasione extracapsulare (Tab. 2, Graf. 3 riquadro). Invece la suddivisione dello stadio II in casi con rari emboli e casi con massiva embolia, ai fini della sopravvivenza, ha fatto registrare curve divergenti e con differenza statisticamente

**Tabella 2**  
**Cagna. Numerosità dei gruppi, intervallo libero da cancro medio e deviazione standard per gruppo, percentuale di non recidivati a 24 mesi post-mastectomia per gruppo, e confronto con l'analisi di sopravvivenza in 29 cagne portatrici di tumore mammario maligno**

	Numero casi	Intervallo libero da cancro in mesi (media±dev.st)	% non recidivati a 24 mesi	Analisi di sopravvivenza
<b>Casi con intervallo libero da cancro noto</b>	29	11,88±9,14	18	
Stadio istologico I	22	16,09±8,58	22	} P<0,01
Stadio istologico II	7	4,21±3,12	0	
Stadio istologico I				
intracapsulare	12	21,83±3,54	40	} P=0,052
extracapsulare	10	9,20±7,72	0	
Diff. tubulo-ghiandolare				
presente	19	17,12±8,28	37	} P=0,08
assente	10	11,64±9,51	17	
Proliferaz. mioepiteliale				
presente	14	11,33±9,07	40	} P=0,32
assente	15	14,05±9,51	0	

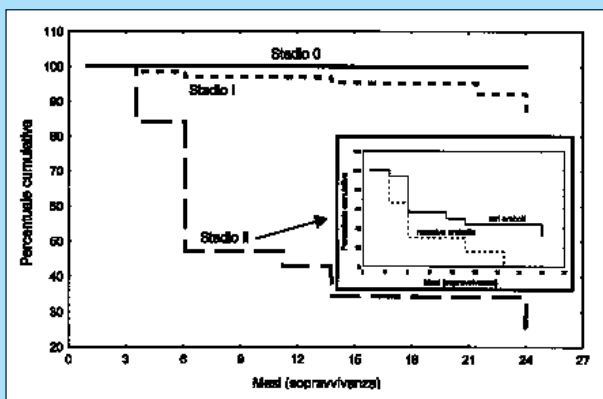


GRAFICO 2 - Cane. Curve di Kaplan&Meier sulla sopravvivenza nei tre gruppi a stadio istologico 0, I e II. Nel riquadro le curve di sopravvivenza dei soli soggetti a stadio II suddivisi in rari emboli e massiva embolia. Per la numerosità dei gruppi ed il confronto statistico si veda la Tabella 1.

significativa (Graf. 2 riquadro), esaltando l'evoluzione rapidamente mortale dei carcinomi mammari con massiva embolia.

Anche le altre variabili istologiche utilizzate nei sistemi di graduazione a fini prognostici, quali la differenziazione tubulo-ghiandolare o la proliferazione mioepiteliale, si sono rivelati significativamente associati alla sopravvivenza (Tab. 1). Entrambi i parametri non hanno rivelato influenza sull'intervallo libero da cancro (Tab. 2).

L'analisi multiparametrica, condotta impiegando tutte le variabili che singolarmente erano risultate significativamente associate alla sopravvivenza (Tab. 6), ha rivelato parametri indipendenti di prognosi (beta più grande dell'errore standard), in ordine decrescente di influenza, l'interessamento linfonodale, seguito dalla graduazione dell'invasività secondo il modello da noi proposto, ed infine dalla dimensione. Mentre l'invasività secondo lo

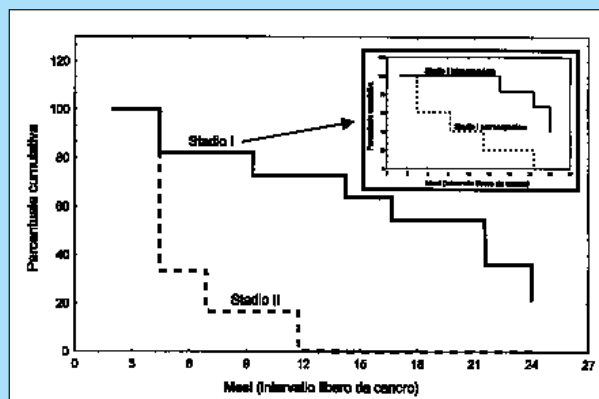


GRAFICO 3 - Cane. Curve di Kaplan&Meier sull'intervallo libero da cancro nei gruppi a stadio istologico I e II. Nel riquadro le curve di intervallo libero da cancro dei soli soggetti a stadio I suddivisi in invasione intracapsulare ed extracapsulare. Per la numerosità dei gruppi ed il confronto statistico si veda la Tabella 2.

schema di Gilbertson e coll. (1983) e la presenza o l'assenza della proliferazione mioepiteliale o della differenziazione tubulo-ghiandolare si sono rivelati, in tale confronto simultaneo, parametri dipendenti (beta più piccolo dell'errore standard).

## Gatto

In Tabella 3 sono riassunti i dati (numero di casi, sopravvivenza media e deviazione standard per gruppo, percentuale di casi censiti a 24 mesi per gruppo, valore di P dell'analisi di sopravvivenza) relativi alla sopravvivenza.

Utilizzando i 32 casi a dimensione nota, anche per la gatta il T, nel confronto simultaneo tra i tre gruppi, si è dimostrato significativamente associato alla sopravvivenza (Graf. 4). Scomponendo i confronti, soggetti del gruppo

**Tabella 3**

**Gatta. Numerosità dei gruppi, sopravvivenza globale media e deviazione standard per gruppo, percentuale di sopravvissuti a 24 mesi post-mastectomia per gruppo, e confronto con l'analisi di sopravvivenza in 54 gatte portatrici di tumore mammario maligno, con T noto in 32 casi.**  
(°confronto contemporaneo di tutti e tre i T; \*confronto contemporaneo di tutti e tre gli stadi istologici 0, I e II)

	Numero casi	Sopravvivenza in mesi (media±dev.st)	% censiti a 24 mesi	Analisi di sopravvivenza
<b>Casi con T noto</b>	32	17,40±10,21	41	°P<0,05
T1	8	23,50±0,92	100	T1 vs T2 P=0,075
T2	15	18,60±11,15	51	T1 vs T3 P<0,01
T3	9	10,00±9,19	22	T2 vs T3 P<0,05
Lfn. negativi	15	23,46±8,36	78	} P<0,01
Lfn. positivi	17	12,05±18,73	22	
<b>Casi con sopravvivenza nota</b>	54	17,24±9,21	43	*P<0,01
Stadio istologico 0	3	>24	100	St0 vs StI P=0,14
Stadio istologico I	22	21,86±4,68	77	St0 vs StII P<0,05
Stadio istologico II	29	12,20±8,01	21	StI vs StII P<0,01
Stadio istologico I				} P=0,05
intracapsulare	8	>24	100	
extracapsulare	14	20,64±5,56	66	
Stadio istologico II				} P<0,05
rari emboli	24	13,58±8,10	23	
massiva embolia	5	5,60±2,60	0	
Diff. tubulo-ghiandolare				} P=0,35
presente	14	17,21±12,65	55	
assente	40	17,25±7,87	50	

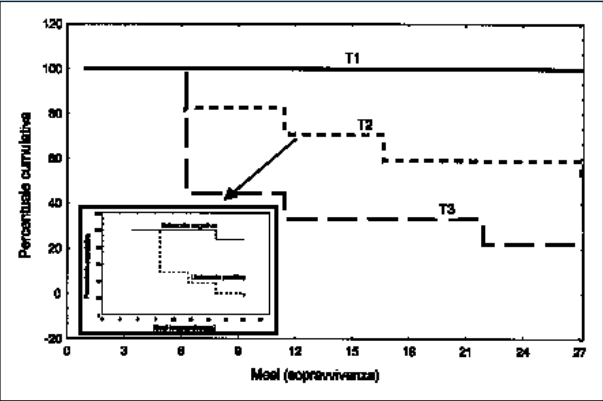


GRAFICO 4 - Gatto. Curve di Kaplan&Meier nei tre gruppi gruppi T1, T2 e T3 e, nel riquadro, del solo gruppo T2 suddiviso in base al coinvolgimento o meno del linfonodo regionale. Per la numerosità dei gruppi ed il confronto statistico si vedano le Tabelle 3 e 5.

T3 (dimensione superiore a 3 cm) hanno presentato una percentuale di censiti a 24 mesi significativamente più bassa di quelli del gruppo T1 (dimensione inferiore a 1 cm) o T2 (dimensione tra 1 e 3 cm), mentre l'andamento della curva di sopravvivenza del gruppo T2 non si è rivelata significativamente diversa da quella del gruppo T1, pur essendo sufficientemente divergenti (sopravvivenza

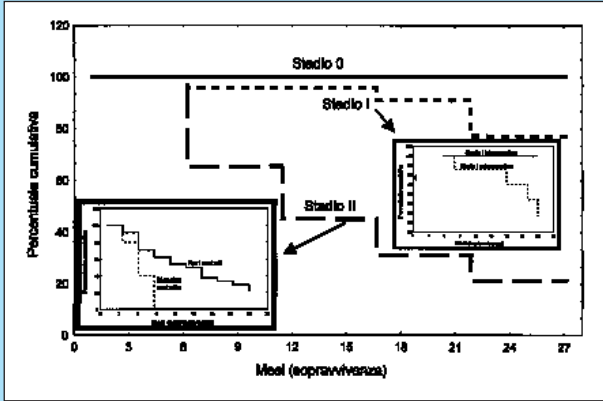


GRAFICO 5 - Gatto. Curve di Kaplan&Meier sulla sopravvivenza nei tre gruppi a stadio istologico 0, I e II. Nel riquadro a destra le curve di sopravvivenza dei soli soggetti a stadio I suddivisi in invasione intracapsulare ed extracapsulare, mentre nel riquadro in basso a sinistra quelle dei soli soggetti a stadio II suddivisi in rari emboli e massiva embolia. Per la numerosità dei gruppi ed il confronto statistico si veda la Tabella 3.

globale 100% a 2 anni del gruppo T1 vs 51% del gruppo T2). L'interessamento del linfonodo regionale si è dimostrato significativamente associato alla prognosi. Con il test di Spearman la dimensione del tumore si è rivelata significativamente correlata sia allo stadio istologico (R=0,37, P<0,05) che al coinvolgimento linfonodale (R=0,39, P<0,05).

Tabella 4

**Cagna. Numerosità dei gruppi, sopravvivenza globale media e deviazione standard per gruppo, percentuale di sopravvissuti a 24 mesi post-mastectomia per gruppo e confronto con l'analisi di sopravvivenza in soggetti che a parità di T presentano differente stato linfonodale**

	Numero casi	Sopravvivenza in mesi (media±dev.st)	% censiti a 24 mesi	Analisi di sopravvivenza
T1-lfn neg.	36	23,21±3,54	87	} P<0,05
T1-lfn pos.	5	19,40±10,28	48	
T2-lfn neg.	14	23,42±1,08	91	} P<0,01
T2-lfn pos.	5	9,20±8,28	20	
T3-lfn neg.	13	22,46±5,54	92	} P<0,01
T3-lfn pos.	10	8,06±6,99	18	

Tabella 5

**Gatta. Numerosità dei gruppi, sopravvivenza globale media e deviazione standard per gruppo, percentuale di sopravvissuti a 24 mesi post-mastectomia per gruppo e confronto con l'analisi di sopravvivenza in soggetti che a parità di T presentano differente stato linfonodale**

	Numero casi	Sopravvivenza in mesi (media±dev.st)	% censiti a 24 mesi	Analisi di sopravvivenza
T1-lfn neg.	6	23,71±0,75	86	} P=0,27
T1-lfn pos.	2	23,00±1,41	50	
T2-lfn neg.	7	25,71±10,29	71	} P=0,00544
T2-lfn pos.	8	12,37±7,96	25	
T3-lfn neg.	2	15,02±12,72	50	} P=0,20
T3-lfn pos.	7	8,57±8,65	14	

Tabella 6

**Analisi multiparametrica tra variabili risultate singolarmente significativamente associate alla prognosi.**

Sia nella cagna che nella gatta solo il tipo di invasione proposto nel presente lavoro dagli autori, l'interessamento linfonodale e la dimensione del tumore si sono rivelati parametri indipendenti di prognosi (Gatta,  $\chi^2 = 29,60$ , gdl=4,  $p=0,00001$ ; cagna  $\chi^2 = 42,67$ , gdl=6,  $P=0,000001$ ; Cox regression model for censored data). Mentre nella gatta il parametro più forte (valore del beta più alto) nel condizionare la sopravvivenza appare essere il tipo di invasione, nella cagna assume tale funzione l'interessamento del linfonodo regionale

		Cagna		Gatta	
		Beta	Errore standard	Beta	Errore standard
Dimensione	T1vsT2vsT3	0,50	0,27	0,71	0,36
Stadio istologico secondo Gilbertson e coll. (1983)	0 vs I vs II	-1,19	1,02	-2,67	1,42
Stadio istologico proposto dagli autori	Non-infiltrante vs invasione intracapsulare vs invasione extracapsulare vs rari emboli nei vasi vs "carcinoma infiammatorio"	1,52	0,48	1,52	0,51
Interessamento del linfonodo regionale	NO vs SI	2,59	0,96	2,11	1,33
Proliferazione mioepiteliale	Presente vs assente	- 0,41	0,57	—	—
Differenziazione tubulo-ghiandolare	Presente vs assente	0,52	0,50	—	—



In funzione della relazione tra dimensione e interessamento linfonodale si è proceduto alla scomposizione delle curve di sopravvivenza in base alla positività o negatività del linfonodo regionale, a parità di T. Dall'analisi è emersa una differenza statisticamente significativa tra la sopravvivenza nel confronto delle curve tra i soggetti linfonodo-positivi e quelli linfonodo-negativi nel gruppo T2 (Graf. 4 riquadro), mentre nessuna differenza è stata rilevata, per il medesimo confronto, in T1 e T3 (Tab. 5).

Lo stadio istologico si è rivelato, utilizzando tutti i 54 casi, una variabile significativamente associata alla prognosi. Le curve di sopravvivenza si sono dimostrate significativamente diverse nel confronto tra stadio 0 o stadio I vs stadio II, ma non nel confronto tra stadio 0 e I (Tab. 3, Graf. 5).

Ai fini della prognosi si è rilevata utile la suddivisione dei casi a stadio I in invasione intracapsulare ed extracapsulare (Tab. 3, Graf. 5 riquadro destro) o quella dei casi a stadio II in rari emboli e massiva embolia (Tab. 3, Graf. 5 riquadro sinistro).

La differenziazione tubulo-ghiandolare non si è registrata un parametro utile a fini prognostici, in quanto le curve di sopravvivenza dei due gruppi non si sono rivelate significativamente diverse (Tab. 3).

L'analisi multiparametrica, condotta impiegando tutte le variabili che singolarmente erano risultate significativamente associate alla sopravvivenza (Tab. 6), ha rivelato parametri indipendenti di prognosi (beta più grande dell'errore standard), in ordine decrescente di influenza, la graduazione dell'invasività secondo il modello da noi proposto, seguita dall'interessamento linfonodale, ed infine dalla dimensione. Mentre l'invasività secondo lo schema di Gilbertson e coll. (1983), si è rivelata, in tale confronto simultaneo, un parametro dipendente (beta più piccolo dell'errore standard).

## DISCUSSIONE

La letteratura sui tumori mammari della cagna e della gatta, tanto per citare alcuni Autori pionieri per tali dati, riporta percentuali di morte da tumore, a due anni post-mastectomia, abbastanza variabili: per la cagna il 43% (Bostock, 1975), il 60% (Else e Hannant, 1979), il 75% (Misdorp e Hart, 1976); per la gatta il 75% (Weijer e Hart, 1983). Più recentemente i dati reperibili in letteratura hanno acquisito maggiore specificità, soprattutto per la cagna. Gilbertson e coll. (1983) hanno dimostrato un rischio progressivamente crescente di sviluppare una recidiva in relazione: a) all'aumento dello stadio istologico che risultava pari a 83% (di recidive) su tutti i casi, ma si poteva scomporre in 25% per i casi a stadio 0, 72% per quelli a stadio I e 95% in quelli a stadio II, b) in base all'aumentare del grado nucleare, che variava dal 58% di casi di recidiva nei tumori differenziati, al 94% per quelli indifferenziati. Lagadic ed Estrada (1990) riportano per tumori infiltranti senza emboli neoplastici nei vasi una sopravvivenza a 24 mesi post-mastectomia del 50% su tutti i soggetti esaminati. Questo dato cambia, se visto in funzione del grado istologico, con una sopravvivenza pari a 86% per il grado I, 43% per quello II e 17% per il grado III. Inoltre, sempre nello stesso studio, nessun sopravvissuto risulta per tumori con emboli endovasali. Yamagami e coll.

(1996) riportano il 92,4% di sopravvivenza per tumori maligni M0 (cioè esenti da metastasi al momento della mastectomia) rispetto al 13,6% per tumori con metastasi al momento della mastectomia. Alla luce dei dati più recenti, risulta chiaro che la percentuale segnalata di sopravvissuti a due anni, in un insieme di soggetti portatori di tumore mammario maligno, dipende molto dalla casistica di partenza: quanti più saranno i tumori maligni infiltranti, o ancora di più quelli con metastasi, tanto più alte saranno le percentuali di morte per tumore alla fine del periodo di follow-up. È questa la probabile spiegazione della forte differenza nei dati di alcuni studi, per esempio il 43% di Bostock (1975) ed il 75% di Misdorp e Hart (1976), sempre che essa non possa essere attribuita ad influenze territoriali.

Partendo da tale considerazione abbiamo impostato il lavoro oggetto della presente indagine: definire variabili di prognosi per neoplasie mammarie maligne, per le quali non sia stata rilevata, al momento della mastectomia, la presenza di metastasi. Ciò in quanto nell'evenienza di metastasi già in atto, la sopravvivenza è spesso influenzata dalla richiesta di eutanasia da parte del proprietario. Inoltre, sempre nel caso di metastasi già in atto, il giudizio prognostico deve tenere in debita considerazione eventuali altre patologie concomitanti. In tal modo, il patologo è poco importante nella formulazione della prognosi, che appare per lo più una competenza da internista. Invece, nel caso di neoplasie maligne apparentemente esenti da metastasi all'atto della mastectomia, risulta decisivo il contributo di alcuni parametri clinici ed istologici di prognosi per definire gruppi a classe di rischio diversa. Le variabili che abbiamo preso in considerazione sono state: a) la dimensione del tumore, b) il coinvolgimento linfonodale, c) lo stadio istologico e d) altre variabili di istoprognosi, quali la differenziazione tubulo-ghiandolare o la proliferazione mioepiteliale, definite da Parodi (1983) parametri minori di prognosi, per indicarne l'importanza secondaria rispetto ai primi elencati.

Nella cagna la dimensione si è rivelata importante nel definire due grosse classi di rischio: tumori con diametro inferiore a 3 cm (T1) e tumori con diametro superiore a 3 cm (T2 e T3). Il confronto tra il risultato da noi ottenuto ed i dati presenti in letteratura non è facilmente delineabile. Un andamento sovrapponibile al nostro è stato registrato da Kurzman e Gilbertson (1986), però in relazione all'intervallo libero da cancro e non alla sopravvivenza, in 54 cagne con tumore mammario maligno invasivo. Mentre in 175 casi di tumori mammari maligni (comprensivi anche casi M+) Yamagami e coll. (1996) registrarono una differenza di sopravvivenza tra T2 e T3 o fra T1 e T3, ma non fra T1 e T2. La dimensione del tumore, graduata con altri criteri, si è comunque sempre rivelata un parametro significativamente associato alla prognosi (vedi bibliografia 35).

Nella gatta la dimensione del tumore ha fatto rilevare curve di sopravvivenza diverse tra i 3 gruppi, anche se il confronto tra T1 e T2 appare al limite della significatività. In una recente indagine, Ito e coll. (1996) hanno ottenuto curve di sopravvivenza significativamente diverse nel confronto tra tumori con diametro uguale o inferiore a 3 cm (T1 e T2) e superiore a 3 cm (T3), risultato peraltro registrato anche da noi ( $P=0,018$ ) anche se nei risultati abbia-

mo preferito mantenere distinti nel confronto T1 e T2. Poco confrontabili sono i nostri risultati con quelli di McEwen e coll. (1984) e di Weijer e coll. (1972) che hanno graduato il volume e non la dimensione della neoplasia: le loro classi non sono strettamente sovrapponibili ai nostri 3 gruppi T1, T2 e T3. Anche nelle loro indagini, comunque, il volume della neoplasia si rivelò un parametro clinico significativamente associato alla prognosi.

I risultati della nostra indagine confermano pertanto che, in caso di neoplasia maligna, un parametro clinico quale la dimensione del tumore può già fornire indicazioni sulla prognosi, qualora si disponga della sola diagnosi istologica di malignità. Va infatti ricordato che a fini prognostici il dato della dimensione del tumore è imprescindibile dalla diagnosi istologica di malignità del tumore.

L'interessamento del linfonodo regionale, accertato su base istologica, si è confermato un utile parametro per la formulazione della prognosi, come risulta da diverse indagini sia nel cane<sup>16, 30</sup> che nel gatto<sup>40, 41</sup>. A nostro avviso è interessante il risultato ottenuto nel confronto delle sopravvivenze tra coinvolgimento o meno del linfonodo regionale a parità di T. Nel cane la presenza di coinvolgimento linfonodale condiziona sopravvivenze significativamente più basse rispetto all'altro gruppo a confronto in tutti i T, mentre nel gatto tale andamento si è registrato solo in T2. Forse in quest'ultima specie un risultato analogo, sia in T1 che in T3, non si è ottenuto a causa della bassa numerosità (n° 2 casi) di uno dei due gruppi a confronto, che poneva la potenza del test statistico ad un livello inferiore. Perciò anche se i confronti non significativi possono essere attribuiti alla bassa numerosità dei gruppi, il reperto del coinvolgimento linfonodale e il suo condizionamento del T, appaiono in grado di fornire indicazioni anche in assenza di una graduazione dell'invasività della neoplasia stessa. Da tale considerazione deriva l'utilità di inviare sempre per l'esame istologico il linfonodo regionale, se asportato. In funzione dei risultati ottenuti, la mastectomia si è rivelata, in tutti i T nel cane e solo in T2 nel gatto, sufficientemente protettiva ai fini della sopravvivenza a 24 mesi post-mastectomia nei tumori maligni senza interessamento linfonodale, mentre possono essere casi suscettibili di trattamento adiuvante, al fine di migliorarne la sopravvivenza, quelli con interessamento linfonodale.

I risultati sullo stadio istologico confermano nostre precedenti segnalazioni con casistiche meno numerose<sup>2, 4, 34</sup>. La graduazione dell'invasività<sup>13</sup> modificata da noi, rispetto alle altre due variabili, dimensione e interessamento linfonodale, si è rivelata indipendente con l'analisi multi-parametrica, cioè fornisce informazioni prognostiche aggiuntive a quelle desumibili dagli altri due parametri. Inoltre si posiziona come quella più forte, cioè condizionante di più la sopravvivenza, nella gatta, mentre viene al secondo posto, dopo l'interessamento linfonodale, nella cagna. Lo schema di graduazione dell'invasività, da noi seguito, è stato introdotto per il cane da Gilbertson e coll. (1983) che lo ha mutuato da quello di Bloom (1950), rivisto da Black e coll. (1955). In seguito è stato adattato al gatto da Mandelli e coll. (1987). Esso si contrappone al sistema di graduazione dell'invasività in tumori a 1) crescita espansiva, 2) moderatamente infiltranti e 3) altamente infiltranti ideato per la donna da Scarff-Bloom-

Richardson. Quest'ultimo schema è stato adottato dall'Organizzazione Mondiale per la Sanità nel 1968<sup>37</sup> ed utilizzato per la cagna da Lagadic ed Estrada (1990) e per la gatta da Weijers e coll. (1972) e da Weijers e Hart (1983). Il primo schema<sup>13</sup>, ai fini dell'invasività, considera il tessuto connettivo che circonda il sistema duttulo alveolare (quindi il superamento della membrana basale di tali strutture), mentre il secondo sistema<sup>37</sup> considera il tessuto connettivo della capsula peritumorale, stirato ma non invaso nelle crescite espansive, invece invaso e superato con raggiungimento dei tessuti circostanti nelle crescite infiltranti. Poiché l'invasione dello stroma extracapsulare deve per forza essere preceduta dalla invasione dello stroma intracapsulare, ci è sembrato interessante dividere lo stadio I nelle due componenti: invasione intracapsulare ed invasione extracapsulare. La suddivisione ha sortito risultati diversi nella cagna e nella gatta. Nella cagna essa si è rivelata associata all'intervallo libero da cancro, risultato quest'ultimo più corto in caso di tumori infiltranti con invasione extracapsulare. Verosimilmente, in tale ultima evenienza, è più facile la permanenza nel campo operatorio di "residui" tumorali, e quindi potrebbe essere giustificata l'attuazione di terapie adiuvanti quella chirurgica. Nella gatta, invece, la suddivisione è risultata significativamente associata alla sopravvivenza, rivelatasi più corta in caso di tumori infiltranti con invasione extracapsulare. È inoltre interessante notare nel grafico n. 5 (riquadro destro) che la sopravvivenza dei soggetti con tumori infiltranti intracapsulari è del 100%, mentre quella dei soggetti con tumori infiltranti extracapsulari è del 63%. Pertanto la mastectomia, unico intervento terapeutico subito dai soggetti, si può considerare sufficientemente protettiva ai fini di una sopravvivenza a due anni nel primo gruppo, ed insufficiente nel secondo. Si arriva perciò a definire un gruppo di soggetti in cui può rivelarsi probante l'impiego di terapie adiuvanti per migliorarne la sopravvivenza a due anni.

La presenza di emboli neoplastici nei vasi, che porta poi al coinvolgimento del linfonodo regionale, caratterizza lo stadio istologico II di Gilbertson e coll. (1983). La risposta di stadio istologico II da parte del patologo deve comunque stimolare il clinico ad escludere che il tumore non sia già in metastasi, nella quale ultima evenienza il soggetto andrebbe posto in una classe di graduazione diversa che è rappresentata dallo stadio istologico III. A questo proposito, ci sembra opportuno un richiamo al c.d. "carcinoma infiammatorio" di cui in medicina veterinaria sono note soltanto le segnalazioni di Cecilia-Castellano e Idiart (1995), Sarli e Capitani (1997), Susaneck e coll. (1983), anche se in recensioni di oncologia clinica veterinaria esso è spesso segnalato tra i tumori della mammella<sup>15, 27, 42, 43</sup>. In medicina umana esso si posiziona prognosticamente come il più infausto tra i cancri al seno, caratterizzato istologicamente da una massiva embolia dei vasi linfatici dermici, spesso in presenza di micrometastasi che possono sfuggire alla diagnostica per immagini. Inoltre, in medicina umana la massiva embolia è il carattere istologico determinante ai fini della diagnosi di "carcinoma infiammatorio", tanto che Ellis e Teitelbaum (1994) suggeriscono anche il termine di carcinomatosi linfatica dermica della mammella. Abbiamo perciò voluto inserire tale elemento diagnostico nella

nostra casistica, che ci poneva in condizione di graduare tutti i soggetti con emboli neoplastici endovasali come casi a stadio II. Nell'ambito degli stadi II con apparente assenza di metastasi, i risultati ottenuti sembrano promettenti, visto che sia nella gatta che nella cagna abbiamo registrato una percentuale di sopravvivenza a 24 mesi significativamente diversa tra i due gruppi a confronto. La suddivisione nei due gruppi dello stadio II si presta anche ad un'altra considerazione. Tutti i soggetti con tumori a stadio II ed a massiva embolia sono morti entro 24 mesi dalla mastectomia e tale dato ricalca, in oncologia comparata, il comportamento del "carcinoma infiammatorio" della donna, per il quale rimane dubbia l'utilità della mastectomia, se non preceduta da chemio e radioterapia pre-operatoria<sup>31</sup>.

In medicina veterinaria, invece, il "carcinoma infiammatorio" viene visto, sia dal punto di vista chirurgico che medico, come trattabile con scarissime possibilità di successo<sup>39, 43</sup>. Ed è quindi utile identificarlo per attribuire allo stadio II "non-carcinoma infiammatorio" una prognosi migliore di quella dello stadio II sospetto "carcinoma infiammatorio", e soprattutto per considerare come passibile di terapia adiuvante il primo e non il secondo. Bisogna comunque ricordare che esistono anche caratteri clinici quali arrossamento, calore, dolore (non sempre osservabili in medicina veterinaria), talvolta in assenza di una massa palpabile, che possono far sospettare il "carcinoma infiammatorio" ed indurre ad una biopsia, anche per escludere la diagnosi differenziale di mastite acuta, prima di una eventuale decisione terapeutica di indirizzo oncologico.

I risultati ottenuti sulla cagna circa l'utilità a fini prognostici della presenza/assenza di proliferazione mioepiteliale o della differenziazione tubulo-ghiandolare ricalcano quanto, su tali parametri, era già noto<sup>18, 24, 30, 44</sup>. Cioè una migliore prognosi in caso di presenza di proliferazione mioepiteliale o di differenziazione tubulo-ghiandolare. Tuttavia essi risultano parametri non influenzanti il giudizio prognostico, se si dispone di altre informazioni come la dimensione, l'interessamento linfonodale, lo stadio istologico.

In medicina veterinaria sono disponibili diversi protocolli di chemioterapia in corso di carcinoma della mammella nella cagna e nella gatta<sup>27, 42, 43</sup>, mentre non sempre sono definite le caratteristiche su base clinico-patologica dei soggetti da trattare. Recentemente è stato proposto uno schema su base multimodale che tiene contemporaneamente conto della dimensione, dello stadio istologico, del grado nucleare e, solo nella cagna, anche dell'espressione dei recettori per gli estrogeni<sup>33</sup>, ma risultati della sua applicazione non sono ancora noti. I risultati della nostra indagine delineano, a tal proposito, le seguenti conclusioni:

- 1) in assenza di una graduazione del tumore, e disponendo solo della diagnosi di malignità, della dimensione e dell'informazione istologica sullo stato del linfonodo regionale:
  - a) i soggetti con qualsiasi T senza coinvolgimento linfonodale sono sufficientemente protetti dalla mastectomia nella sopravvivenza a 2 anni;
  - b) i soggetti con tumori, soprattutto dei gruppi T2 e T3, che presentano coinvolgimento linfonodale possono essere indirizzati per un eventuale protocollo chemioterapico adiuvante;

2) disponendo della graduazione del tumore:

- a) i soggetti con tumore a stadio 0 o a stadio I con invasione intracapsulare sono sufficientemente protetti a 2 anni dalla mastectomia;
- b) i soggetti con tumore a stadio I extracapsulare o a stadio II "non-carcinoma infiammatorio" possono essere indirizzati per un eventuale protocollo chemioterapico adiuvante;
- c) i soggetti a stadio II con la diagnosi di "carcinoma infiammatorio", in base alle segnalazioni finora presenti in medicina veterinaria<sup>39, 43</sup> ed ai risultati della presente indagine, che mettono in evidenza una mortalità del 100% nei soggetti molto prima dello scadere dei 24 mesi dalla mastectomia, dovrebbero essere considerati non tanto per un protocollo adiuvante, quanto solo per una eventuale terapia sintomatica.

## Ringraziamenti

*Gli autori ringraziano sentitamente i colleghi che hanno contribuito a fornire dati sul follow-up, dottori: Coan Mario (Udine), Dalla Mura Savina (Udine), Fracasso Paolo (Udine), Gabassi Enrico (Udine), Merici Carlo (Udine), Nicolosi Alfio (Udine), Pintaldi Paolo (Bologna), Rossi Federica (Bologna), Roussel Elena (Udine), Rubini Marco (Bologna), Sassetti Carla (Bologna), Schiavi Luigi (Udine), Schiavi Silvia (Udine), Terni Daniele (Bologna), Terragni Rossella (Bologna), Tosolini Paolo (Udine), Vignoli Massimo (Bologna).*

## Parole chiave

*Cane, gatto, carcinoma, mammella, dimensione, invasione, sopravvivenza.*

## Key words

*Dog, cat, carcinoma, mammary gland, size, invasion, survival.*

## Bibliografia

1. Allen S.W., Mahaffey E.A.: Canine mammary neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. *Journal of American Animal Hospital Association*, 25, 540-546, 1989.
2. Apostolou J., Sarli G., Capitani O., Marcato P.S.: Considerazioni prognostiche sui tumori mammari multipli della cagna e della gatta. *Veterinaria*, 12(4), 7-13, 1998.
3. Bartnitzke S., Motzko H., Caselitz J., Kornberg M., Bullerdiek J., Schloot W.: A recurrent marker chromosome involving chromosome 1 in two mammary tumors of the dog. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1992, 60: 2, 135-137.
4. Benazzi C., Preziosi R., Sarli G., Galeotti M., Marcato P.S.: Observations on the correlation between histological grading and survival times of canine and feline malignant mammary tumours. *Biomedical Research*, 10(1), 25-34, 1999.
5. Black M.M., Opler S., Spaer F.D.: Survival in breast cancer cases in relation to the structure of the primary tumor and regional lymph nodes. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 100, 543, 1955.
6. Bloom H.J.G.: Prognosis in carcinoma of the breast. *British Journal of Cancer*, 4, 259, 1950.

7. Bostock D.E.: The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *European Journal of Cancer*, 11, 389-396, 1975.
8. Castagnaro M., Bozzetta E., Casalone C., Nervi G.C., Biolatti B., Caramelli M.: Ki-67 index in feline mammary carcinomas: correlation with the one-year post-surgical survival time and argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) count. *Atti 15th Meeting of the ESPV. Alghero (SS) 16-19 September 1997*, pg. 39.
9. Castagnaro M., Casalone C., Ru G., Nervi G.C., Bozzetta E., Caramelli M.: Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) count as indicator of post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science*, 64, 97-100, 1998.
10. Cecilia Castellano M., Idiart J.R.: Inflammatory mammary carcinoma in the bitch. *Revista de Medicina Veterinaria Buenos Aires*. 1995, 76: 4, 244-248.
11. Ellis D.L., Teitelbaum S.L.: Inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer*, 33, 1045-1047, 1974.
12. Else R.W., Hannant D.: Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *The Veterinary Record*, 104, 296-304, 1979.
13. Gilbertson S.R., Kurzman D., Zachrau R.E., Hurvitz A.I., Black M.M. Canine mammary epithelial neoplasms: biological implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*, 20, 127-142, 1983.
14. Hampe, J.F., Misdorp, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organization*, 50, 111-133, 1974.
15. Hahn K.A., Adams W.H.: Feline mammary neoplasia: biological behaviour, diagnosis and treatment alternatives. *Feline Practice*, 25(2):5-11, 1997.
16. Kurzman I.D., Gilbertson S.R.: Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine & Surgery (Small Animal)*, vol. 1, n. 1, 25-32, 1986.
17. Ito T., Kkadosawa T., Mochizuki M., Matsunaga S., Nishimura R., Sasaki N.: Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(8), 723-726, 1996.
18. Lagadic M., Estrada M.: Tumeurs mammaires de la chienne: critères du pronostic histologique et intérêt d'un grading. *Recueil de Médecine Vétérinaire de L'Ecole D'Alfort*, 166(11), 1035-1042, 1990.
19. MacEwen E.G., Hajes A.A., Harvey H.J., Patnaik A.K., Mooney S., Passe S. Prognostic factors for feline mammary tumours. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 185, 201-204, 1984.
20. Mandelli G., Scanziani E., Cairolì F.: "Grading" istologico delle neoplasie mammarie dei carnivori. *La Clinica Veterinaria*, 110, 347-357, 1987.
21. Marcato P.S.: Patologia mammaria animale. Edagricole. Bologna, 1992.
22. Mayr B., Plasser J., Schlegler W., Loupal G., Burtscher H.: Deleted chromosome 32 in mammary neoplasms in two domestic dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 1992, 33: 6, 277-278.
23. Miyoshi N., Tateyama S., Ogawa K., Yamaguchi R., Kuroda H., Yasuda N., Shimizu T.: Abnormal structure of the canine oncogene, related to the human c-yes-1 oncogene, in canine mammary tumor tissue. *American Journal of Veterinary Research*, 52:12, 2046-2049, 1991.
24. Misdorp W., Hart A.A.M.: Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 56(4), 779-786, 1976.
25. Misdorp W., Weijer K.: Animal model of human disease: Feline mammary carcinoma. *American Journal of Pathology*, 98(1), 573-576, 1980.
26. Misdorp W.: Quelques aspects comparatifs des cancers de la mamelle chez la chienne, la chatte et la femme. *Recueil de Médecine Vétérinaire de L'Ecole D'Alfort*, 148, 583-590, 1972.
27. Morrison W.B.: Cancer in dogs and cats: medical and surgical management. Williams & Wilkins, 1998.
28. Moulton J.: Tumors of mammary gland. in "Tumors in domestic animals", III Ed, 1990.
29. Owen L.N.: Clinical stages (TNM) of canine mammary tumours. In: TNM classification of tumours in domestic animals. World Health Organization, First Edition, Geneva, Switzerland, 1980.
30. Parodi A.L.: Les éléments du pronostic des cancers mammaires de la chienne. *Pratique Médicale & Chirurgicale de L'Animal de Compagnie*, 18(2), 31-36, 1983.
31. Perez C.A., Fields J.N., Fracasso P.M., Philipott G., Soares R.L., Taylor M.E., Lockett M.A., Rush C.: Management of locally advanced carcinoma of the breast. II. Inflammatory carcinoma. *Cancer*, 74: 466-476, 1994.
32. Preziosi R., Sarli G., Benazzi C., Marcato P.S. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 113, 301-313, 1995.
33. Romanelli G.: Nuovi approcci al trattamento dei tumori della mammella. *Atti 35° Congresso SCIVAC - Aggiornamenti in Oncologia*, 165-178, 1997.
34. Sarli G., Preziosi R., Benazzi C., Capitani O., Marcato P.S.: Tempo di sopravvivenza o di recidiva nei tumori mammari del cane e del gatto: utilità degli indicatori di proliferazione e della ploidia del DNA. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 10, 57-66, 1996.
35. Sarli G.: Gli elementi di prognosi nei tumori mammari maligni della cagna e della gatta. *Veterinaria*, 11(1), 5-17, 1997.
36. Sarli G., Capitani O.: Carcinoma infiammatorio della mammella in una cagna. *Atti LI Convegno Nazionale SISVet*, 567-568, 1997.
37. Scarff R.W., Torloni H.: Histological typing of breast tumours (International histological classification of tumours no. 2). WHO, Geneva, 1968.
38. Strandberg J.D., Goodman D.G.: Animal model of human disease: Canine mammary neoplasia. *American Journal of Pathology*, 75(1), 225-228, 1974.
39. Susaneck S.J., Allen T.A., Hoopes J., Withrow S.J., Macy D.W.: Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *Journal of American Animal Hospital Association*, 19, 971-976, 1983.
40. Weijer K., Hart A.A.M.: Prognostic factors in feline mammary carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 70, 709-716, 1983.
41. Weijer K., Head K.W., Misdorp W., Hampe J.F.: Feline malignant mammary tumors. I. Morphology and biology: some comparisons with human and canine mammary carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 49, 1697-1704, 1972.
42. White R.A.S.: Manual of small animal oncology. KCO, Worthing, West Sussex, 1991.
43. Withrow S.J., MacEwen E.G.: Small animal clinical oncology. W.B. Saunders Company, second edition, 1996.
44. Yamagami T., Kobayashi T., Takahashi K., Sugiyama M.: Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(11), 1079-1083, 1996.