

INDAGINE IMMUNOISTOCHEMICA DELL'ESPRESSIONE DELL'ORMONE DELLA CRESCITA NELL'IPERPLASIA E NELLE NEOPLASIE MAMMARIE DEL CANE

CLAUDIO PETTERINO*, ROBERTA BOVO**, MARCO MARTINI*, VALENTINA ZAPPULLI*, MASSIMO CASTAGNARO*

*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata, e Igiene Veterinaria
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Padova - AGRIPOLIS - Legnaro (PD)

**Medico Veterinario, Padova

Riassunto

Lo scopo del presente studio è quello di determinare mediante indagine immunohistochemica l'espressione dell'ormone della crescita (GH) nei tumori e nelle iperplasie della ghiandola mammaria del cane e studiarne l'eventuale correlazione con la tipologia della lesione. I campioni chirurgici ottenuti per mastectomia di 82 cani di sesso femminile sono stati fissati in formalina, inclusi in paraffina. I preparati istologici, ottenuti da mammella contenente il nodulo, sono stati classificati secondo i criteri standard della WHO. L'evidenziazione del GH è stata realizzata mediante una comune metodica immunohistochemica utilizzando un anticorpo policlonale anti-GH ed il sistema di rilevazione EnVision/DAB. Campioni di tessuto ipofisario sono stati inclusi in ciascuna reazione immunohistochemica come controlli positivi. La valutazione dell'espressione del GH è stata eseguita valutando la percentuale di cellule positive ed attribuendo i seguenti punteggi: -, nessuna cellula positiva; -/+, 1 - 10 %; +, 11 - 50 %; ++, 51 - 75 %; +++, 76 - 100 %; l'intensità di colorazione è stata suddivisa in leggera, moderata o intensa. La valutazione immunohistochemica delle sezioni di tessuto ha evidenziato immunoreattività anti-GH eterogenea sia per la percentuale di cellule positive che per il grado di intensità della reazione. È stata osservata una differenza statisticamente significativa nell'espressione del GH sia per quanto riguarda la percentuale di cellule positive che per l'intensità di colorazione tra tumori maligni e iperplasia (% di cellule positive $p < 0.0001$; intensità di colorazione $p < 0.0001$) e tra tumori benigni ed iperplasia (% di cellule positive $p < 0.0001$; intensità di colorazione $p < 0.0001$). Il nostro studio conferma studi precedenti sull'evidenziazione del GH in differenti istotipi di tumori mammari e fornisce nuovi dati circa il suo pattern di espressione e sulle differenze nei diversi tipi di lesione neoplastica e iperplastica. Sulla base delle differenze osservate, il presente lavoro fornisce ulteriori dati sul possibile coinvolgimento del GH nello sviluppo e nella progressione del tumore mammario nella specie canina.

Summary

The aim of this study was to detect by immunohistochemical means the Growth Hormone (GH) expression in canine mammary gland tumors and hyperplasia and to study the relationship with the lesion type. Tissue sections from formalin-fixed, paraffin embedded surgical mastectomy samples from 82 bitches, were classified according to WHO and immunostained using a polyclonal anti-GH and EnVision/DAB method. Positive controls were performed by immunostaining canine pituitary gland tissue. The evaluation of GH expression was performed evaluating the percentage of labelled cells as follow: -, none; -/+, 1 - 10 %; +, 11 - 50 %; ++, 51 - 75 %; +++, 76 - 100 %; labelling intensity was scored as slight, moderate and intense. Immunohistochemical examination of the tissue sections demonstrated heterogenous anti-GH immunoreactivity in terms of percentage of positive cells and staining intensity. A statistically significant difference in intensity and percentage of labelled cells was seen between malignant tumors versus hyperplasia (% of positive cells $p < 0.0001$; intensity $p < 0.0001$) and benign tumors versus hyperplasia (% of positive cells $p < 0.0001$; intensity $p < 0.0001$). Our study confirm that GH is expressed in different type of mammary gland tumors heterogeneously and adds new data about its pattern of expression in mammary gland neoplasia and hyperplasia supporting the possible involvement of hormone locally produced in the development and progression of canine mammary tumors.

INTRODUZIONE

Diversi autori riportano la presenza di GH (Growth Hormone - Ormone della Crescita) nell'iperplasia mammaria ed in differenti istotipi di tumore mammario¹⁻³ e ciò è anche dimostrabile dall'evidenziazione di un'immuno-reattività anti-GH correlata alla presenza di GH-mRNA³⁻⁵. L'esistenza di una produzione locale in sede mammaria è stata osservata anche nella gatta⁶, mentre nella donna, durante la seconda metà della gravidanza, è stata riportata l'espressione di un gene variante del GH a livello placentare, con concomitante soppressione del GH ipofisario, una mancata secrezione pulsatile ed una risposta indebolita, in fase post-partum, al GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone)³⁻⁶. Il GH prodotto a livello del tessuto mammario è molto simile a quello ipofisario, indicando che lo stesso gene può codificare sia per il GH ipofisario che per quello extra-ipofisario (mammario)⁷. A questo livello il GH si dimostra biologicamente attivo², rivestendo un ruolo fisiologico nella differenziazione della ghiandola stessa⁸, processo quest'ultimo che richiede il reclutamento di cellule staminali, la loro successiva differenziazione e sviluppo in epitelio duttale sotto l'influenza degli IGFs (Insulin-Like Growth Factors). L'ipotesi che l'ormone della crescita, o il suo effettore l'IGF-1, stimolino la proliferazione del tessuto epiteliale mammario trova conferma nell'osservazione di un sensibile aumento del tessuto ghiandolare mammario in scimmie Rhesus trattate con GH o con GH+IGF-1⁸.

Esiste una differenza di produzione di GH nel tessuto mammario in dipendenza della fase estrale in cui l'animale si trova. Infatti, la produzione intracellulare di GH è di solito maggiore durante la fase luteinica del ciclo estrale rispetto all'anestro, e risulta stimolata in seguito all'esposizione di progestinici di sintesi che interagiscono con i recettori per il progesterone³. La presenza di una relazione tra la dose di progestinico somministrata e l'iperplasia mammaria è stata dimostrata anche sperimentalmente⁹. La produzione di GH indotta dal progesterone o dai suoi analoghi probabilmente partecipa allo sviluppo ciclico della ghiandola mammaria, ma potrebbe essere coinvolta nella formazione/progressione delle neoplasie mammarie nel cane agendo come stimolatore della proliferazione cellulare³. Inoltre, è stato riportato che in alcuni casi la produzione di GH a livello mammario sia così elevata da determinare l'insorgenza di acromegalia e sintomatologia clinica correlata ad un eccesso di GH circolante nel cane^{2, 10-12} e nella gatta⁵. Il fatto che i progestinici siano in grado di indurre la pro-

duzione di GH è anche rafforzata dal fatto che tali sostanze sono state proposte come trattamento farmacologico nei cani affetti da deficienza congenita di GH¹³.

Il presente studio si propone di valutare la distribuzione e i livelli di espressione del GH nel tessuto mammario canino, iperplastico e neoplastico, nel tentativo di evidenziare una qualche differenza di espressione tra i differenti tipi di lesioni istologiche.

MATERIALI E METODI

Il presente studio è stato condotto su prelievi di noduli mammari provenienti da 82 soggetti femmine di specie canina aventi un'età compresa tra i 2 ed i 16 anni (vedi Tabella 1). I tessuti, fissati in formalina (soluzione di formaldeide tamponata al 10%), sono stati successivamente ridotti ed inclusi in paraffina. Le sezioni di tessuto dello spessore di 4 µm sono state colorate secondo una comune colorazione in ematossilina/eosina e le lesioni sono state classificate secondo gli standard diagnostici dell'Organizzazione Mondiale della Sanità¹⁴.

Immunohistochimica

Per l'indagine immunohistochimica sono state preparate sezioni di tessuto incluso in paraffina dello spessore di 3 µm e processate per evidenziare l'espressione del GH nel tessuto mammario. Le sezioni montate su vetrini polilissinati sono state sparaffinate in xilene e reidratate con passaggi successivi in scala di alcoli sino all'acqua. L'inibizione delle perossidasi endogene è stata eseguita immergendo i preparati in una soluzione 1:4 di idrogeno perossido al 3% in metanolo assoluto per 30 minuti a temperatura ambiente. I preparati sono stati quindi lavati e reidratati in soluzione di tampone fosfato (PBS) pH 7.2 e quindi posti in tampone citrato al 10% pH 6.0. Dopo il trattamento termico in forno a microonde a 750 Watts della durata di 2 minuti per tre volte, le sezioni sono state raffreddate per 15 minuti. I vetrini sono stati lavati in PBS con tre lavaggi consecutivi della durata di 10 minuti ciascuno ed incubati in soluzione di BSA 5% in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente al fine di bloccare le reazioni aspecifiche. Successivamente le sezioni sono state prima incubate per 60 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo primario policlonale anti-GH (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) diluito 1:200 in PBS, poi con anticorpo secon-

ABBREVIAZIONI E SIMBOLI

GH	Growth Hormone	Ormone della Crescita
PBS	Phosphate Buffer Solution	Soluzione di Tampone Fosfato
BSA	Bovine Serum Albumine	Albumina Sierica Bovina
GH-mRNA	Growth Hormone-messenger RNA	RNA messaggero per l'ormone della Crescita
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone	Fattore Rilasciante l'Ormone della Crescita
IGFs	Insulin-Like Growth Factors	Fattori di Crescita Insulino-simili
IGFBP	Insulin Growth Factor Binding Protein	Proteina che lega i Fattori Insulino Simili
DAB		3,3'-diaminobenzide tetraidrocloruro

Tabella 1
Casi clinici con rispettiva diagnosi istopatologica e i risultati dell'espressione del GH nei campioni esaminati

NUMERO CASO	SOGGETTO	TIPO DI LESIONE	SCORE E % di POSITIVITA	TIPO DI POSITIVITA
1	Cane femmina (Età 11 anni)	Carcinoma tubulare semplice	++ (63)	LEGGERA
2	Cane femmina (Età 9 anni)	Carcinoma tubulare semplice	+ (18)	MODERATA
3	Cane femmina (Età 8 anni)	Carcinoma tubulare semplice	+ (33)	LEGGERA
4	Cane femmina (Età 8 anni)	Carcinoma tubulare semplice	+ (32)	LEGGERA
5	Cane femmina (Età 10 anni)	Carcinoma tubulare semplice	+++ (88)	DA LEGGERA A MODERATA
6	Cane femmina (Età 11 anni)	Carcinoma tubulare semplice	+++ (99)	LEGGERA
7	Cane femmina (Età 10 anni)	Carcinoma tubulare semplice	NEGATIVO	NEGATIVO
8	Cane femmina (Età 12 anni)	Carcinoma tubulare semplice	+ (27)	DA LEGGERA A MODERATA
9	Cane femmina (Età 10 anni)	Carcinoma tubulare semplice	NEGATIVO	NEGATIVO
10	Cane femmina (Età 7 anni)	Carcinoma tubulare semplice	+ (44)	LEGGERA
11	Cane femmina (Età 10 anni)	Carcinoma tubulare semplice	+ (35)	DA MODERATA AD INTENSA
12	Cane femmina (Età 10 anni)	Carcinoma tubulare semplice	NEGATIVO	NEGATIVO
13	Cane femmina (Età 10 anni)	Carcinoma tubulare semplice	NEGATIVO	NEGATIVO
14	Cane femmina (Età 8 anni)	Carcinoma tubulare complesso	+++ (96)	DA MODERATA AD INTENSA
15	Cane femmina (Età 8 anni)	Carcinoma tubulare complesso	+++ (86)	DA LEGGERA A MODERATA
16	Cane femmina (Età 16 anni)	Carcinoma tubulare complesso	NEGATIVO	NEGATIVO
17	Cane femmina (Età 6 anni)	Carcinoma tubulare complesso	-/+ (4)	LEGGERA
18	Cane femmina (Età 6 anni)	Carcinoma tubulare complesso	-/+ (2)	LEGGERA
19	Cane femmina (Età 12 anni)	Carcinoma tubulare complesso	+ (13)	DA LEGGERA A MODERATA
20	Cane femmina (Età 12 anni)	Carcinoma tubulare complesso	+++ (76)	DA MODERATA AD INTENSA
21	Cane femmina (Età 12 anni)	Carcinoma tubulare complesso	+ (46)	DA LEGGERA A MODERATA
22	Cane femmina (Età 11 anni)	Carcinoma tubulare complesso	+ (46)	DA LEGGERA A MODERATA
23	Cane femmina (Età 7 anni)	Carcinoma tubulare complesso	+ (18)	LEGGERA
24	Cane femmina (Età 11 anni)	Carcinoma papillare semplice	+ (36)	LEGGERA
25	Cane femmina (Età 11 anni)	Carcinoma papillare semplice	NEGATIVO	NEGATIVO
26	Cane femmina (Età 15 anni)	Carcinoma papillare semplice	+++ (83)	INTENSA
27	Cane femmina (Età 15 anni)	Carcinoma papillare semplice	++ (69)	MODERATA
28	Cane femmina (Età 8 anni)	Carcinoma solido semplice	NEGATIVO	NEGATIVO
29	Cane femmina (Età 16 anni)	Carcinoma solido semplice	+++ (89)	LEGGERA
30	Cane femmina (Età 12 anni)	Carcinoma solido semplice	NEGATIVO	NEGATIVO
31	Cane femmina (Età 10 anni)	Carcinoma solido semplice	NEGATIVO	NEGATIVO
32	Cane femmina (Età 5 anni)	Carcinoma solido semplice	+ (22)	LEGGERA
33	Cane femmina (Età 5 anni)	Carcinoma solido semplice	NEGATIVO	NEGATIVO
34	Cane femmina (Età 15 anni)	Carcinoma solido semplice	+ (21)	LEGGERA
35	Cane femmina (Età 9 anni)	Carcinoma solido semplice	NEGATIVO	NEGATIVO
36	Cane femmina (Età 9 anni)	Carcinoma solido complesso	+ (41)	MODERATA
37	Cane femmina (Età 9 anni)	Carcinoma solido complesso	-/+ (1)	DA LIEVE A MODERATA
38	Cane femmina (Età 9 anni)	Carcinoma solido complesso	+ (33)	LEGGERA
39	Cane femmina (Età 9 anni)	Carcinoma solido complesso	-/+ (9)	DA LEGGERA A MODERATA
40	Cane femmina (Età 14 anni)	Carcinoma solido complesso	NEGATIVO	NEGATIVO
41	Cane femmina (Età 14 anni)	Carcinoma solido complesso	NEGATIVO	NEGATIVO
42	Cane femmina (Età 9 anni)	Carcinoma misto	+++ (93)	LEGGERA
43	Cane femmina (Età 7 anni)	Carcinoma misto	NEGATIVO	NEGATIVO
44	Cane femmina (Età 10 anni)	Carcinoma misto	+ (31)	MODERATA
45	Cane femmina (Età 10 anni)	Carcinoma misto	NEGATIVO	NEGATIVO
46	Cane femmina (Età 10 anni)	Carcinoma misto	NEGATIVO	NEGATIVO
47	Cane femmina (Età 8 anni)	Carcinoma misto	+++ (98)	INTENSA
48	Cane femmina (Età 8 anni)	Carcinoma misto	+ (23)	INTENSA
49	Cane femmina (Età 12 anni)	Carcinoma misto	NEGATIVO	NEGATIVO
50	Cane femmina (Età 6 anni)	Carcinoma misto	NEGATIVO	NEGATIVO
51	Cane femmina (Età 13 anni)	Carcinoma misto	NEGATIVO	NEGATIVO
52	Cane femmina (Età 10 anni)	Carcinoma misto	+++ (87)	DA MODERATA AD INTENSA
53	Cane femmina (Età 11anni)	Carcinoma anaplastico	NEGATIVO	NEGATIVO
54	Cane femmina (Età 11anni)	Adenoma	+ (26)	DA LEGGERA A MODERATA
55	Cane femmina (Età 8 anni)	Adenoma	NEGATIVO	NEGATIVO
56	Cane femmina (Età 7 anni)	Adenoma	NEGATIVO	NEGATIVO
57	Cane femmina (Età 9 anni)	Adenoma	+ (48)	LEGGERA
58	Cane femmina (Età 9 anni)	Adenoma	+ (37)	LEGGERA
59	Cane femmina (Età 8 anni)	Adenoma	NEGATIVO	NEGATIVO
60	Cane femmina (Età 8 anni)	Adenoma	-/+ (5)	DA MODERATA A INTENSA
61	Cane femmina (Età 12 anni)	Adenoma	+ (27)	LEGGERA
62	Cane femmina (Età 8 anni)	Adenoma	NEGATIVO	NEGATIVO
63	Cane femmina (Età 8 anni)	Adenoma	+ (39)	LEGGERA
64	Cane femmina (Età 7 anni)	Adenoma	NEGATIVO	NEGATIVO
65	Cane femmina (Età 10 anni)	Adenoma	+ (12)	LEGGERA
66	Cane femmina (Età 2 anni)	Tumore misto benigno	NEGATIVO	NEGATIVO
67	Cane femmina (Età 9 anni)	Tumore misto benigno	NEGATIVO	NEGATIVO
68	Cane femmina (Età 10 anni)	Iperplasia funzionale	-/+ (10)	MODERATA
69	Cane femmina (Età 11anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
70	Cane femmina (Età 12 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
71	Cane femmina (Età 12 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
72	Cane femmina (Età 9 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
73	Cane femmina (Età 9 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
74	Cane femmina (Età 10 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
75	Cane femmina (Età 6 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
76	Cane femmina (Età 10 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
77	Cane femmina (Età 9 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
78	Cane femmina (Età 10 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
79	Cane femmina (Età 10 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
80	Cane femmina (Età 13 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
81	Cane femmina (Età 11 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO
82	Cane femmina (Età 10 anni)	Iperplasia funzionale	NEGATIVO	NEGATIVO

dario anti-immunoglobulina di coniglio utilizzando il sistema EnVision+™ Peroxidase (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA), ed infine colorate con 3,3' diaminobenzide tetraidrocloruro (DAB SK-4100, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) per 3 minuti. La controcolorazione è stata seguita con ematossilina di Harry.

Campioni di tessuto ipofisario canino sono stati inclusi in ciascuna reazione immunohistochimica come controlli positivi. I controlli negativi sono stati processati sostituendo l'incubazione con anticorpo primario con una soluzione di BSA 0.5% in PBS.

Valutazione semiquantitativa ed analisi statistica

La valutazione dell'espressione di GH nelle sezioni di tessuto incluse nello studio è stata eseguita valutando la percentuale di cellule positive in 10 campi microscopici a 400 ingrandimenti, attribuendo i seguenti punteggi: -, nessuna cellula positiva; +/-, 1-10% di cellule positive; +, 11-50% di cellule positive; ++, 51-75% di cellule positive; +++, 76-100% di cellule positive. L'intensità della reazione osservata per ciascun campione è stata classificata come leggera, moderata o intensa.

Le differenze di espressione tra i differenti tipi di lesioni istologiche sono state valutate statisticamente con il test non-parametrico di U di Mann-Whitney per l'intensità di colorazione, e l'analisi della varianza per quanto riguarda la valutazione delle percentuali di cellule positive. Quest'ultimo test è stato preceduto da trasformazione arcsen e dei dati e da un successivo accertamento della normalità della distribuzione dei dati tramite test di Kolmogorov-Smirnov. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il programma SPSS Inc, (Chicago, USA).

RISULTATI

Le valutazioni riassuntive dell'immunoreattività anti-GH nei tumori mammari oggetto di questo studio sono riportate in Tabella 1.

Il primo dato emerso è che l'anticorpo anti-GH utilizzato è in grado di riconoscere l'ormone della crescita nell'ipofisi canina nelle cui sezioni esaminate abbiamo osservato approssimativamente il 75% di cellule con intensa positività (Figure 1A e 1B).

La positività valutata nelle neoplasie mammarie presenta caratteri comuni, indipendentemente dal grado di intensità e dal numero di cellule neoplastiche reattive. Tutti i casi positivi presentano una colorazione citoplasmatica con aspetto tipicamente da granuloso a diffuso (da Figura 2 a Figura 5). Una moderata positività citoplasmatica è stata osservata occasionalmente anche nell'epitelio duttale (Figura 6) ed in alcune strutture epiteliali riconducibili a gemme di proliferazione epiteliale con positività da moderata (Figura 7) ad intensa. Raramente abbiamo osservato una lieve positività citoplasmatica nella componente non epiteliale.

È stata osservata una certa variabilità nell'espressione del GH all'interno dei singoli gruppi in cui sono stati classificati i tumori. All'interno del gruppo del carcinoma semplice, come pure in quelli del carcinoma complesso,

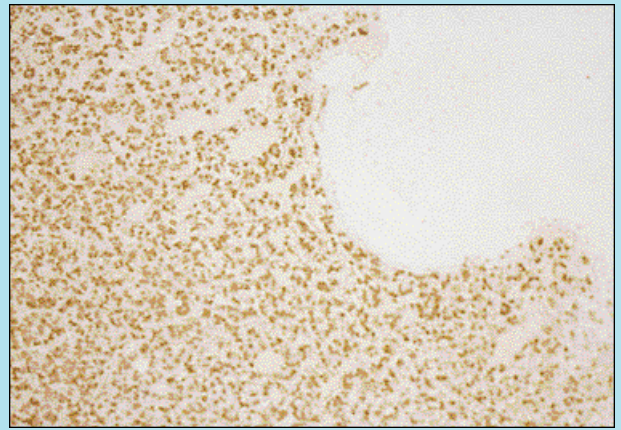


Figura 1A

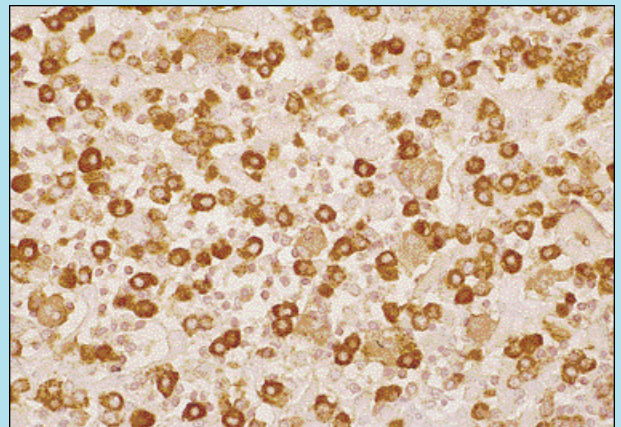


Figura 1B

FIGURA1 - A) Ipofisi canina: si osservi l'elevato numero di cellule positive per il GH (100 X). B) Ipofisi canina: è possibile evidenziare l'intensa e specifica reattività dell'anticorpo utilizzato che evidenzia il contenuto citoplasmatico delle cellule ipofisarie deputate alla produzione di GH (400 X).

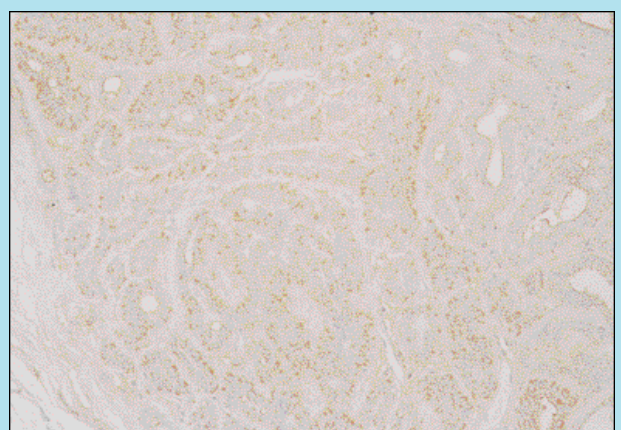


FIGURA 2 - Mammella, cane: si osserva una moderata positività citoplasmatica per il GH in un caso di carcinoma tubulare (100 X).

del carcinoma misto, dell'adenoma, si può riscontrare una reattività variabile sia per quanto riguarda le singole percentuali che per il modo in cui si manifesta la positività. In tutti questi gruppi, inoltre, compaiono dei casi istologici negativi. In 13 carcinomi tubulari semplici 4 casi non pre-

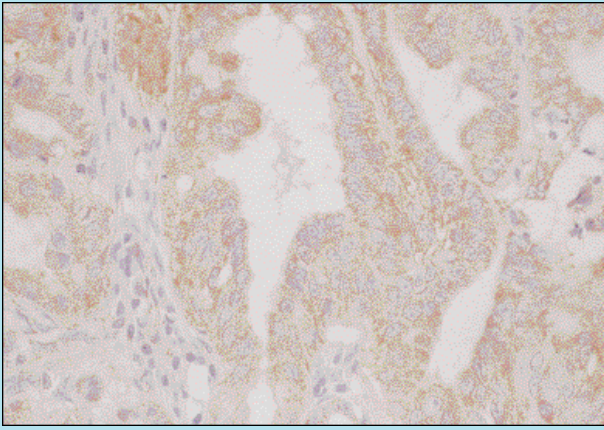


FIGURA 3 - Mammella, cane: si osservi l'intensa immunoreattività anti-GH citoplasmatica nelle cellule epiteliali di un carcinoma tubulare (400 X).

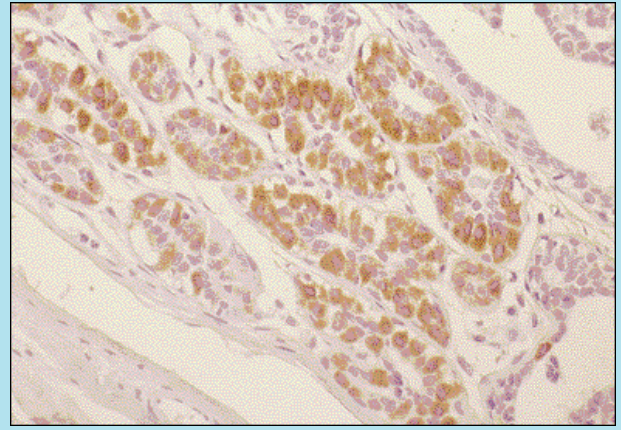


FIGURA 5 - Mammella, cane: intensa positività citoplasmatica in un adenoma (200 X).

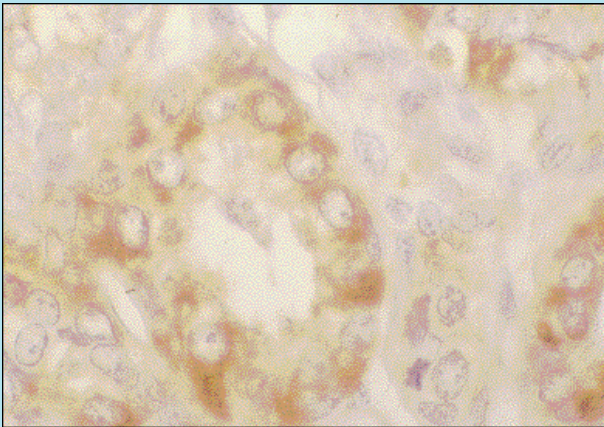


FIGURA 4 - Mammella, cane, carcinoma tubulare: particolare di un tubulo con cellule che presentano un'intensa positività citoplasmatica anti-GH (1000 X).

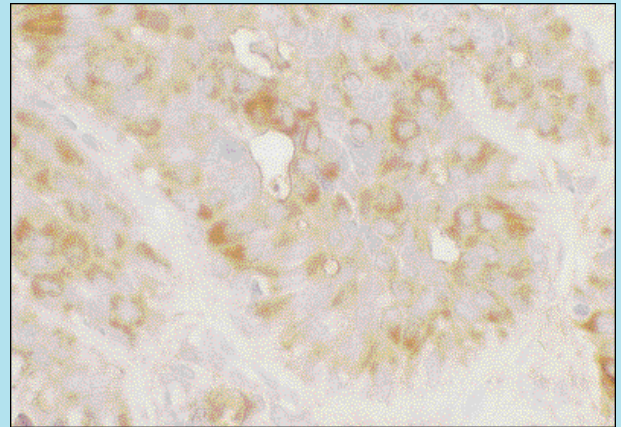


FIGURA 6 - Mammella, cane: si osservi la moderata positività anti-GH limitata alle cellule dell'epitelio di un dotto (200 X).

sentavano immunoreattività per la presenza di GH, mentre in 10 carcinomi tubulari complessi solo 1 caso si presentava negativo. Per quanto riguarda i carcinomi semplici (2 casi) si presentavano entrambi positivi. Di 8 carcinomi solidi semplici 5 casi sono risultati negativi e in 6 carcinomi solidi complessi solo 2 casi erano negativi. In 11 casi di carcinoma misto 6 casi sono risultati negativi, per contro in 2 casi di tumore misto benigno non sono state osservate cellule positive per la presenza di GH. In 12 adenomi, 5 casi si presentavano negativi. L'iperplasia funzionale della ghiandola mammaria non ha fatto rilevare un'immunoreattività anti-GH, tranne che nel caso numero 68 (Figura 8), analogamente ai due casi considerati di tumore misto benigno. Per ciascun gruppo in cui sono state classificate le neoplasie sono, comunque, stati calcolati media, mediana, moda, deviazione standard, valore minimo, valore massimo, come riportato in Tabella 2.

Considerando, invece, i confronti effettuati all'interno dei gruppi di neoplasie mammarie valutate e quelli tra gruppo e gruppo, soltanto alcuni sono risultati significativi (Tabella 3). Infatti, differenze statisticamente significative sono emerse esclusivamente dai confronti tra l'adenoma e l'iperplasia, sia per quanto riguarda la percentuale di cellule neoplastiche risultate positive ($F = 87.094$, $P <$

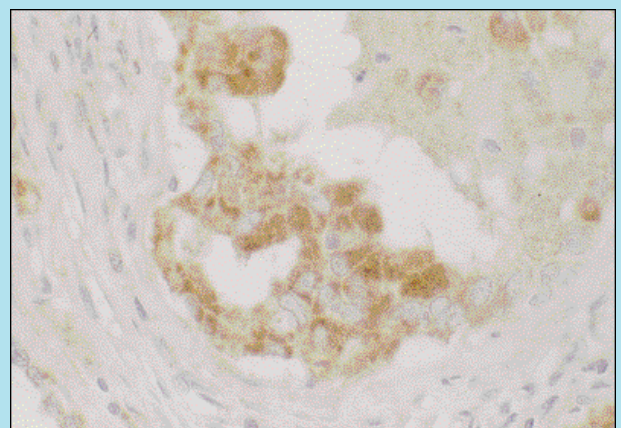


FIGURA 7 - Mammella, cane: strutture epiteliali riconducibili a gemme di proliferazione epiteliale con positività da moderata (400 X).

0.0001), sia rispetto al tipo di intensità della positività espressa dalle stesse ($U = 37.500$, $P < 0.0001$). Anche considerando il confronto tra i tumori maligni e l'iperplasia funzionale si sono osservate delle differenze statisticamente significative. Queste riguardano la percentuale di cellule

Tabella 2
Statistica descrittiva per ciascuna tipologia di lesione istopatologica

GRUPPO DI NEOPLASIA	MEDIA	DEVIAZIONE STANDARD	MEDIANA	MODA	MINIMO	MASSIMO
Carcinoma semplice tubulare	35.91	33.92	32.00	0.00	0	99
Carcinoma complesso tubulare	47.00	37.01	52.50	ND	0	83
Carcinoma semplice papillare	16.50	30.86	0.00	0.00	0	89
Carcinoma semplice solido	32.87	40.37	11.00	0.00	0	89
Carcinoma complesso solido	17.50	17.06	15.00	ND	0	41
Carcinoma misto	30.18	41.58	0.00	0.00	0	98
Adenoma	16.17	18.17	8.50	0.00	0	48

che hanno espresso positività ($F = 39.342$, $P < 0.0001$) ed il tipo di intensità della stessa ($U = 37.500$, $P < 0.0001$). I confronti tra tumori maligni ed adenoma semplice e tumore misto benigno non hanno rilevato differenze significative né rispetto alla percentuale di cellule positive ($F = 3.726$, $P = 0.058$) né al tipo di intensità ($U = 287.000$, $P = 0.174$). Analoghi risultati sono emersi nel confronto tra tumori maligni semplici e tumori maligni complessi, sia per quanto riguarda la valutazione della percentuale di cellule positive ($F = 0.119$, $P = 0.732$) che il tipo di intensità ($U = 138.000$, $P = 0.101$).

DISCUSSIONE

La crescita e lo sviluppo della ghiandola mammaria, sia in condizioni fisiologiche che neoplastiche, rappresenta un processo complesso e non completamente chiarito. È noto che alcuni fattori di crescita e sostanze ormonali (endogene e/o esogene) sono coinvolte sia nello sviluppo che nel-

l'evoluzione della patologia neoplastica mammaria. È noto che lo stato ormonale del soggetto può influenzare positivamente l'insorgenza di neoplasie mammarie e ciò è stato indirettamente ipotizzato in relazione al fatto che l'ovariectomia in giovane età riduce sensibilmente il rischio di neoplasie mammarie nella cagna¹⁵. Infatti, il rischio dello sviluppo di neoplasie mammarie in cagne ovariectomizzate prima del primo estro è dello 0.05%, mentre aumenta al 26% dopo il secondo estro¹⁵. In particolare è stato dimostrato sperimentalmente in cani di razza Beagle che la somministrazione di progestinici (medrossiprogesterone acetato e proligestone) può determinare l'insorgenza di tumori mammari nel cane¹⁶. Nei tessuti mammari dei soggetti di tale studio è stato osservato lo sviluppo di alveoli e dotti adiacenti ad aree di epitelio duttale iperplastico¹⁶. In alcuni soggetti di ciascun gruppo di animali trattati in questo studio è stato osservato lo sviluppo di tumori mammari benigni (adenomi semplici e papillari, tumori benigni complessi e tumori misti)¹⁶. Secondo questi autori la più alta incidenza di tumori mammari potrebbe essere associata con il fatto che i progestinici possono indurre la produzione locale, nel tessuto mammario di GH¹⁶. Alcuni autori hanno ritrovato GH-mRNA anche nei tumori mammari maligni del cane e hanno segnalato, inoltre, un'associazione tra proliferazioni benigne in questa sede, conseguenti a stimolazione con progestinici di sintesi, ed un innalzamento del livello ematico sia di GH che di IGF^{5,17}.

Il GH è espresso nella ghiandola mammaria del cane, così come avviene nel gatto⁵, ed un'immunoreattività al GH è stata correlata con la presenza di GH-mRNA². In questa sede l'ormone della crescita si dimostra biologicamente attivo e sembra possa rivestire un ruolo fisiologico nella differenziazione della ghiandola stessa⁵. La sequenza di cDNA del GH prodotto in sede mammaria in conseguenza dei trattamenti progestinici è uguale a quella del GH ipofisario⁷.

Nel presente lavoro viene osservata la presenza di un'effettiva reattività immunohistochimica con anticorpo anti-GH nei vari tipi di neoplasie mammarie considerate, pur-

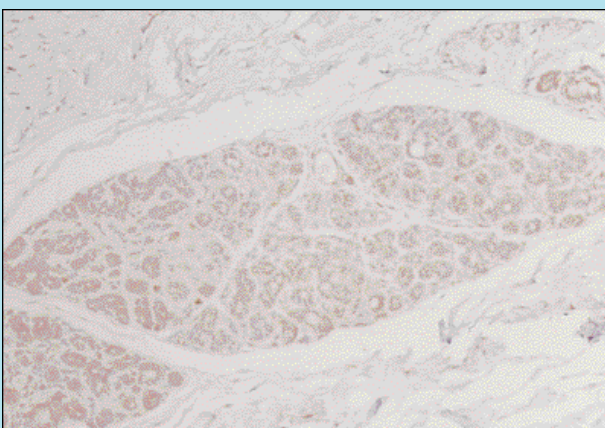


FIGURA 8 - Mammella, cane: lieve positività in un caso di iperplasia mammaria non-infiammatoria (100 X).

Tabella 3
Risultati dei confronti statistici eseguiti per confrontare le differenze tra le diverse lesioni istopatologiche

CONFRONTI	%		U	POS	
	F	P		P	P
CARCINOMA SEMPLICE TUBULARE VS CARCINOMA COMPLESSO TUBULARE	0.121	0.731	43.500		0.186
CARCINOMA SEMPLICE TUBULARE VS CARCINOMA SEMPLICE PAPILLARE	0.007	0.935	19.000		0.477
CARCINOMA COMPLESSO TUBULARE VS CARCINOMA SEMPLICE PAPILLARE	0.033	0.859	19.000		0.945
CARCINOMA SEMPLICE SOLIDO VS CARCINOMA COMPLESSO SOLIDO	0.607	0.451	12.500		0.142
CARCINOMA SEMPLICE SOLIDO VS CARCINOMA MISTO	1.623	0.220	34.500		0.442
<u>ADENOMA</u> VS <u>IPERPLASIA</u>	87.094	<0.0001	37.500		<0.0001
TUMORI MALIGNI VS ADENOMA SEMPLICE E TUMORE MISTO BENIGNO	3.726	0.058	287.000		0.174
<u>TUMORI MALIGNI</u> VS <u>IPERPLASIA</u>	39.342	<0.0001	150.000		<0.0001
TUMORI MALIGNI SEMPLICI VS TUMORI MALIGNI COMPLESSI	0.119	0.732	138.000		0.101

tuttavia con una mancanza di omogeneità d'espressione. Vista l'ampia variabilità dei dati ottenuti non è ancora ben chiaro se sussista una correlazione tra espressione di GH ed istotipo neoplastico. Nella nostra casistica l'iperplasia funzionale si è dimostrata negativa ad eccezione di un caso (n° 68). Questo fenomeno si scontra, perciò, con le osservazioni precedenti e con i dati emersi da altri lavori in cui era stata osservata una certa percentuale di positività anche nell'iperplasia non infiammatoria. Questa eterogeneità può dipendere, come ipotizzato anche da altri gruppi di ricerca³, da differenti fattori come le procedure e l'adeguatezza della fissazione dei campioni istologici, il tempo trascorso dal prelievo chirurgico del tumore in sede chirurgica, ed eventuali trattamenti ormonali (prevalentemente con prodotti a base di progestinici di sintesi) non riportati dal medico veterinario curante. Un altro fattore estremamente importante è rappresentato dallo stato ormonale del soggetto al momento dell'intervento chirurgico e quindi del campionamento del tessuto e della sua fissazione. Infatti, i livelli di progesterone circolante possono variare in funzione della fase del ciclo dell'animale³. In questo senso, la diversa positività riscontrata nei casi considerati potrebbe essere correlata allo stato ormonale del soggetto

in esame. Molti autori hanno dimostrato che la produzione locale di GH nel tessuto mammario non neoplastico è maggiore durante la fase luteinica del ciclo estrale rispetto all'anestro⁵. Esiste anche una variabilità nella secrezione pulsatile di GH a seconda della fase del ciclo estrale¹⁸, e questa ipotesi è supportata da indagini condotte in sistemi cellulari in vitro^{19,20}. Inoltre, la produzione di GH indotta dal progesterone a livello mammario promuove la proliferazione e la differenziazione del tessuto mammario¹⁸. Un'aumentata incidenza di tumori mammari (adenomi semplici e papillari, tumori benigni complessi e tumori misti) in soggetti trattati con progestinici è ipoteticamente correlabile con l'effetto di questi ultimi nell'indurre una produzione locale di GH¹⁶. In base a queste osservazioni è stato ipotizzato che l'induzione della produzione di GH in sede mammaria indotta dai progestinici potrebbe essere uno dei fenomeni che spiegherebbero la suscettibilità del tessuto mammario all'insorgenza di tumori^{21,22}. Un altro aspetto è rappresentato però dallo stato recettoriale, ovvero l'espressione dei recettori per estrogeni e progesterone. In un recente lavoro scientifico è stato osservato che spesso le cellule epiteliali della ghiandola mammaria positive al GH esprimono contemporaneamente anche i recettori per

il progesterone, ma non sempre si osserva la relazione inversa⁷. In alcuni casi di carcinoma mammario è stato osservato un elevato livello di GH mRNA anche se le stesse cellule non esprimevano il recettore per il progesterone^{4,6}. Questa osservazione ha fatto sospettare che alcune cellule neoplastiche potrebbero continuare a produrre GH anche dopo la trasformazione maligna e divenire quindi ormone-indipendenti ovvero mantenere una produzione locale di GH indipendentemente da una stimolazione progestinica^{4,6}.

GH, IGFs e IGFBP (Insulin Growth Factor Binding Protein) potrebbero avere un importante ruolo nella regolazione dei processi di mammogenesi, lattazione ed involuzione mammaria²³. Questi fattori potrebbero infatti determinare la creazione di un microambiente tissutale favorevole alla proliferazione cellulare e potenzialmente anche alla trasformazione maligna, alla promozione della crescita cellulare e/o alla progressione dei tumori mammari^{23,24}. Nel loro complesso queste osservazioni portano ad ipotizzare che una produzione locale di GH possa rappresentare un evento in grado di indurre proliferazione cellulare, eventualmente con modalità di tipo autocrino/paracrino.

I dati scientifici disponibili non sono definitivamente indicativi del fatto che la produzione di GH possa influenzare lo sviluppo delle neoplasie in un senso piuttosto che in un altro. Sebbene i dati bibliografici attuali possano indicare che l'ormone della crescita possa stimolare la proliferazione cellulare, sono necessari ulteriori studi che indaghino contemporaneamente lo stato recettoriale delle neoplasie e/o dell'iperplasia mammaria in confronto con il tessuto mammario normale, lo stato ormonale del soggetto e l'eventuale contemporanea assunzione di progestinici di sintesi per comprendere a pieno il suo ruolo biologico, le modalità per cui viene espresso e valutare il suo possibile valore prognostico e/o terapeutico.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano per la cortese e preziosa collaborazione tecnica i Sigg. Enrico Gallo ed Emanuele Zanetti.

Parole chiave

Ormone della crescita, GH, tumore mammario, iperplasia mammaria, cane.

Key words

Growth Hormone, GH, mammary gland tumor, mammary gland hyperplasia, dog.

Bibliografia

- Misdorp W: Progestagens and mammary tumors in dogs and cats. *Acta Endocr (Copenh)* 125 (Suppl. 1): 27-31, 1991.
- Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, et al: Progestin-Induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*, 134: 287-292, 1994.
- van Garderen E, De Wit M, Voorhout WF, et al: Expression of Growth Hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *Am J Pathol*, 150: 1037-1047, 1997.
- Mol JA, van Garderen E, Selman PJ, et al: Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. *J Clin Invest*, 95: 2028-2034, 1995.
- Mol JA, van Garderen E, Rutteman GR, et al: New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of Growth Hormone in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Molec Biol* 57 (1-2): 67-71, 1996.
- Mol JA, Henzen-Logmans SC, Hageman PH, et al: Expression of the gene encoding Growth Hormone in the human mammary gland. *J Clin Endocr Metab*, 80: 3094-3096, 1995.
- Lantinga-van Leeuwen IS, Oudshoorn M, Mol JA: Canine mammary growth hormone gene transcription initiation in the pituitary-specific start site in the absence of Pit-1. *Molec Cell Endocr*, 150 :121-128, 1999.
- Ng ST, Zhou J, Adesanya DD, et al: Growth Hormone treatment induces mammary gland hyperplasia in aging primates. *Nat Med* 3: 1141-1144, 1997.
- Ishikawa T, Inoue S, Kakinuma C, et al: Growth-stimulating effect of dienegeest, a synthetic steroid on the rodent, canine and primate mammary glands. *Toxicology*, 151: 91-101, 2000.
- Concannon P, Altszuler N, Hampshire J, et al: Growth hormone, prolactin, and cortisol in dogs developing mammary nodules and an acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology*, 106: 1173-1177, 1980.
- Eigenmann JE, Eigenmann RY, Rijnberk A, et al: Progestagen-controlled growth hormone over production and naturally occurring canine diabetes and acromegaly. *Acta Endocr (Copenh)*, 104: 167-176, 1983.
- Rijnberk A, Eigenmann JE, Belshaw BE, et al: Acromegaly associated with transient over production of growth hormone in a dog. *JAVMA*, 177: 534-537, 1980.
- Kooistra HS, Voorhout G, Selman PJ, et al: Progestin-induced growth hormone (GH) production in the treatment of dogs with congenital GH deficiency. *Domest Anim Endocrinol*, 15: 93-102, 1998.
- Misdorp W, Else RW, Hellmén M, et al: *Histological Classification of Mammary Tumors of Dog and the Cat. Second Series, Volume VII: 19-25. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1999.*
- MacEwen EG e Withrow SJ: Tumors of the mammary gland. In: *Small animal clinical oncology. 2nd edition, S.J. Withrow, E.G., MacEwen, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 356-372, 1996.*
- Selman PJ, van Garderen E, Mol JA, van den Ingh TS: Comparison of the histological changes in the dog after treatment with the progestins medroxyprogesterone acetate and proligestone. *Vet Q*, 17: 128-133, 1995.
- Bichell DP, Kikuchi K, Rotwein P: Growth hormone rapidly activates insulin-like growth factor I gene transcription in vivo. *Mol Endocrinol* 6: 1899-1908, 1992.
- Kooistra HS, den Hertog E, Okkens AC, et al: Pulsatile secretion pattern of growth hormone during the luteal phase and mid-anoestrus in beagle bitches. *J Reprod Fertil*, 119: 217-222, 2000.
- Anderson NG: Growth hormone activates mitogeno-activated protein kinase and S6 kinase and promotes intracellular tyrosine phosphorylation in 3T3-F442A preadipocytes. *Biochem J* 284: 649-652, 1992.
- Campbell GS, Pang L, Miyasaka TT, et al: Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3- F442A fibroblasts. *J Biol Chem* 267: 6074- 6080, 1992
- Rijnberk A e Mol JA: Progestin-induced hypersecretion of growth hormone: an introductory review. *J Reprod Fertil Suppl*, 51 :335-338, 1997.
- Russo IH e Russo J: Progestagens and mammary gland development: Differentiation versus carcinogenesis. *Acta Endocr (Copenh)*, 125 (Suppl 1):7-12, 1991.
- Mol JA, Selman PJ, Sprang EP, et al: The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and binding proteins in the normal and neoplastic mammary glands in the bitch: a review. *J Reprod Fertil Suppl*, 51:339-344, 1997.
- Mol JA, Lantinga-van Leeuwen IS, van Garderen E, et al: Mammary growth hormone and tumorigenesis-lessons from the dog. *Vet Q*, 21:111-115, 1999.