

MASTOCITOMA INTESTINALE FELINO: RASSEGNA BIBLIOGRAFICA CRITICA E COMPARATIVA E CONTRIBUTO CASISTICO

M. MARÀ, G. DI GUARDO, G. MARRUCHELLA, L. DELLA SALDA

Università degli Studi di Teramo - Facoltà di Medicina Veterinaria
Dipartimento di Scienze Biomediche Compare

Riassunto

Il mastocitoma intestinale felino (M.I.F.) è un raro tumore del gatto ad eziologia ignota, la cui diagnosi non risulta del tutto agevole. Nel presente lavoro, che si propone innanzitutto come rassegna sullo stato dell'arte delle conoscenze finora disponibili in materia, vengono descritti gli aspetti anatomico-istopatologici, immunoistochimici ed ultrastrutturali di un caso di M.I.F. pervenuto alla nostra osservazione. I campioni tissutali, oltre alle routinarie tecniche istologiche, sono stati assoggettati alle seguenti metodiche istochimiche: Blue di Toluidina, Giemsa, PAS (con e senza diastasi), ematossilina fosfotungstica di Mallory (PTAH), Masson, Luxol-Fast-Blue e Grimelius. Sugli stessi sono stati pure saggiati, mediante opportune tecniche immunoistochimiche, anticorpi monoclonali e policlonali nei confronti di: actina (SMA), calponina, vimentina, enolasi neurono-specifica (NSE), fattore VIIIb (vWF), triptasi ed alpha-1-antitripsina. Sono state infine allestite sezioni semifini ed ultrafini per le relative indagini di microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

Le cellule tumorali apparivano PAS-positive (con e senza diastasi), presentando al contempo immunoreattività nei confronti di vimentina e triptasi. All'indagine ultrastrutturale, inoltre, gli elementi neoplastici mostravano numerose vescicole citoplasmatiche, talvolta coalescenti, al cui interno si rinvenivano occasionali granuli e fine materiale fibrillare. Cellule con nuclei bilobati e citoplasma con caratteristici granuli elettrondensi (granulociti eosinofili) costituivano un concomitante reperto di comune riscontro.

I dati morfologici, abbinati a quelli immunoistochimici ed ultrastrutturali, ci hanno quindi consentito di formulare una diagnosi conclusiva di M.I.F., mentre da questo caso è emersa, al pari di quanto riportato in letteratura, la necessità di un adeguato protocollo di indagini clinico-laboratoristiche, di cruciale importanza ai fini di un corretto inquadramento diagnostico di tale condizione neoplastica nella specie felina.

Summary

Feline intestinal mast cell tumour (FIMCT) is a rare neoplastic condition of the cat with unknown aetiology and a difficult diagnostic approach.

This paper is aimed at providing a comprehensive review on such tumour, as well as at describing the clinical and pathological features of a spontaneous FIMCT case occurred in an 11-years-old male cat.

Tissue sections from the animal's intestinal lesions were stained by Haematoxylin and Eosin, Toluidine Blue, Giemsa, Periodic-acid-Schiff (PAS, with and without diastase), Mallory's Phosphotungstic Acid Haematoxylin, Masson's trichrome, Luxol-Fast-Blue and Grimelius. Immunohistochemistry was performed by means of antibodies against Smooth Muscle Actin, Calponin, Vimentin, Neuron-Specific-Enolase, Factor VIIIb, Mast Cell Tryptase and Alpha-1-Antitrypsin. Furthermore, tissue sections were obtained for transmission electron microscope investigations.

Neoplastic cells showed PAS-positivity (either with and without diastase), being at the same time immunoreactive for both vimentin and tryptase. Ultrastructurally, they also exhibited several, sometimes coalescent cytoplasmic vesicles, occasionally containing granules and a finely fibrillar material. Eosinophils were also a common finding. Morphological, immunohistochemical and ultrastructural data allowed us to make a final diagnosis of FIMCT.

As a conclusive remark, we would like to recommend here, accordingly to what already published in the literature, the absolute need for an adequate protocol of clinico-pathological and laboratory investigations, in order to achieve a proper diagnosis of such tumour condition in the cat.

PARTE GENERALE: MASTOCITI E MASTOCITOMI

I mastociti furono osservati per la prima volta al microscopio nel 1863, ad opera di Von Recklinghausen, mentre la loro attuale definizione fu coniata per la prima volta nel 1878, da parte di Paul Ehrlich, il quale denominò tali cellule "mastzellen" (cellule ben nutrite) per via del cospicuo numero di prominenti granuli citoplasmatici che egli stesso ascrisse alla presenza di materiale fagocitato (Foreman, 1993). Da allora, soprattutto in questi ultimi anni, molti studi sono stati compiuti nell'ambito sia della biologia, sia della patologia umana e comparata di queste affascinanti cellule, viste le notevoli implicazioni che esse hanno in numerosi processi fisiologici e fisiopatologici, quali in particolare quelli a sfondo infiammatorio ed allergico-iperergico, nonché in una serie di patologie a carattere iperplastico-displastico (mastocitosi) e neoplastico (mastocitomi) che selettivamente riguardano tali elementi cellulari.

In condizioni fisiologiche, i mastociti rappresentano elementi cellulari liberi del tessuto connettivo derivanti, al pari dei granulociti basofili che ne rappresenterebbero la corrispettiva cellula circolante, da elementi progenitori della serie mieloide. Si tratta, dal punto di vista morfologico, di voluminose cellule sferiche, ovoidali o leggermente allungate, raggruppate particolarmente attorno ai vasi sanguigni e caratterizzate dalla presenza di grossi granuli metacromatici (Dellmann e Brown, 1981; Monesi, 1992; Foreman, 1993). Al microscopio elettronico, alcuni di questi granuli appaiono elettron-densi e presentano una substruttura interna cristallina, mentre altri contengono lamelle di materiale denso, immerse in una matrice più elettron-trasparente. Questi ultimi si osservano di solito in prossimità delle cisterne dell'apparato di Golgi e si ritiene che rappresentino granuli neoformati. Gli spazi fra i granuli, che di solito appaiono fittamente stipati, sono occupati da poche cisterne di reticolo endoplasmatico rugoso, poliribosomi e mitocondri, mentre l'apparato di Golgi è generalmente situato vicino al nucleo.

I granuli mastocitari contengono proteoglicani (eparina e condroitin-solfato B ed E), proteasi (chimasi e triptasi) (Hill e Martin, 1998), istamina, serotonina, polisaccaridi ed acido ialuronico (Dellmann e Brown, 1981). I mastociti possono pertanto esplicare, per effetto dell'eparina in essi contenuta, un'azione anticoagulante, impedendo così la trasformazione del fibrinogeno in fibrina.

Inoltre, essi sono in grado di provocare vasocostrizione e di influire sulla permeabilità capillare, mentre si ritiene che tali cellule contribuiscano, al tempo stesso, alla trasformazione della sostanza fondamentale del connettivo (Dellmann e Brown, 1981). Di derivazione midollare, come più sopra accennato, i mastociti vedono la loro attività proliferativa e differenziazione dipendenti da uno specifico fattore di crescita, lo *stem cell factor* (SCF) (Kitamura et al., 1977; Williams, 1990; Flanagan e Leder, 1990). Questo è prodotto dalle cellule stromali e dai fibroblasti midollari ed interagisce con un apposito recettore trans-membranario fosfo-tirosinchinasico (c-kit), strutturalmente simile a sua volta ai recettori per il *colony-stimulating factor* (CSF) (Yarden et al., 1987; Qiu et al., 1988). Si tratta, dunque, di un fattore di crescita multifunzionale coinvolto anche nei processi di chemiotassi, adesione, differenziazione, proliferazione, sopravvivenza, sintesi e secrezione dei mediatori

dei mastociti. Altri fattori importanti per la chemiotassi, la sopravvivenza e l'attivazione dei mastociti sono, singolarmente o in associazione, l'interleuchina (IL)-3, l'IL-4, l'IL-9 e l'IL10 (Ihle et al., 1983; Smith e Renwick, 1986; Schmitt et al., 1987; Hultner et al., 1989; Moeller et al., 1989; Tsuji et al., 1990; Hultner et al., 1990; Thompson-Snipes et al., 1991). Un altro fattore di crescita di origine fibroblastica, il *nerve growth factor* (NGF), sarebbe parimenti in grado di favorire la proliferazione mastocitaria qualora iniettato in topi neonati (Aloe e Levi-Montalcini, 1977). L'*interferone- γ* (IFN- γ) ed il *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1), al contrario, sembrano inibire lo sviluppo dei mastociti (Broide et al., 1989; Nafziger et al., 1990).

I mastociti dei diversi tessuti presentano considerevoli differenze nelle loro caratteristiche morfologiche, biochimiche e funzionali e questa eterogeneità è stata osservata dapprima nel ratto, in cui i mastociti della mucosa intestinale sono distinguibili da quelli cutanei in virtù delle loro proprietà secretorie ed istochimiche (Enerback, 1966a). In base alle caratteristiche strutturali, istochimiche e biochimiche, infatti, si possono distinguere, almeno nei modelli sperimentali murini, due sottopopolazioni di mastociti, la prima delle quali distribuita nei tessuti connettivi della cute e del peritoneo, localizzata a ridosso dei vasi sanguigni e dei nervi periferici loco-regionali, le cosiddette *connective tissue mast cells* (CTMCs), la seconda a livello delle superfici mucose intestinali e polmonari, le cosiddette *mucosal mast cells* (MMC).

L'eterogeneità degli elementi mastocitari è oggi ben documentata, oltre che nel ratto e nel topo, anche nell'uomo e nell'ovino ed è definita, come più sopra accennato, in rapporto alle caratteristiche istochimiche, ai mediatori contenuti nei granuli ed alle proprietà funzionali di tali cellule (Hill e Martin, 1998).

Nell'uomo esiste una classificazione in tre gruppi, basata sulla caratterizzazione immunocitochimica, che specificamente comprende: 1) i mastociti contenenti solo triptasi (MCt), che corrisponderebbero alle MMCs; 2) i mastociti contenenti triptasi, chimasi, carbosipeptidasi e catepsina G (MCtc), a loro volta corrispondenti alle CTMCs; 3) i mastociti con localizzazioni tissutali diverse, contenenti chimasi e carbosipeptidasi (MCc).

Questa eterogeneità dei mastociti umani è stata identificata anche nel cane e nel gatto e, sebbene inizialmente definita sulla base dell'espressione della caratteristica metacromasia dopo fissazione in formalina e colorazione con il blue di toluidina, essa viene ora opportunamente determinata in tali specie animali in base al differente contenuto degli enzimi proteolitici triptasi e chimasi, che sono stati recentemente riconosciuti, sia sotto il profilo biochimico, sia sotto il profilo immunologico, simili a quelli dell'uomo (Noli e Miolo, 2001). Enerback (1966 a, b, c) riporta che i mastociti della mucosa intestinale di ratto, al contrario dei mastociti cutanei, risulterebbero sensibili alla fissazione in formalina, così da non riuscire ad essere identificati nelle sezioni istologiche di routine. Tuttavia, eseguendo appropriate fissazioni e colorazioni seriate con alcian blue e safranina, i mastociti mucosali si colorano in blue, a differenza di quelli connettivali, che si colorano invece in rosso. La predetta sequenza di colorazione è stata validamente impiegata al fine di caratterizzare mastociti di varia origine o provenienti da diverse specie animali e questa variabilità

nelle affinità tintoriali riflette, in ultima analisi, la presenza di differenti proteoglicani nelle due sottopopolazioni di CTMCs e MMCs (Hill e Martin, 1998).

Anche dal punto di vista funzionale i mastociti sono caratterizzati da eterogeneità, in quanto essi svolgono una serie di funzioni biologiche ben più articolate e complesse rispetto a quelle insite nella "classica" concezione dei mastociti come cellule aspecificamente coinvolte nei processi infiammatori, o come cellule sensibilizzate ed effettrici nelle reazioni di ipersensibilità di tipo I.

La complessità e la varietà di tali funzioni biologiche risultano sottolineate dalle straordinarie capacità di attivazione, nonché di sintesi e rilascio di mediatori ed enzimi quali eparina, triptasi, chimasi, istamina, leucotrieni, prostaglandine e citochine (IL-8, in particolare) ad azione chemiotattica nei confronti dei granulociti neutrofili, basofili ed eosinofili (Noli e Miolo, 2001). I mastociti inoltre, come già in precedenza accennato, sono in grado di rilasciare TNF- α , dando così il via a cascate secondarie di citochine pro-infiammatorie di origine leucocitaria (Hill e Martin, 1998; Noli e Miolo, 2001). La liberazione di TNF- α da parte dei mastociti induce un incremento nell'espressione di selectine e di integrine, con conseguente adesione dei leucociti all'endotelio vasale ed attivazione leucocitaria.

I mastociti sarebbero inoltre in grado di "complessare" e fagocitare, uccidendoli, alcuni tipi di batteri, possedendo quindi, al pari dei macrofagi, funzioni battericide (Noli e Miolo, 2001). Come fonti di citochine proinfiammatorie e/o immunomodulatrici, i mastociti sono in grado di produrre IL-1 (Noli e Miolo, 2001), IL-3, IL-4, IL-5; IL-6 (Marcato, 1997; Noli e Miolo, 2001), GM-CSF (Hill e Martin, 1998) e molte chemiochine, la cui sintesi è indotta da stimoli IgE-dipendenti o indipendenti, mentre recentemente è stata messa in evidenza anche la loro capacità di presentazione nei confronti di antigeni batterici e parassitari attraverso un meccanismo MHC-II-mediato e di espressione, al tempo stesso, di specifiche molecole costimolatrici nei riguardi dell'attivazione dei linfociti T (Fox et al., 1994; Mudde et al., 1995; Frandji et al., 1996; Tkaczyk et al., 1998; Malaviya e Abraham, 2001).

Entrando ora nel merito dei processi neoplastici elettivamente coinvolgenti i mastociti, vale a dire i mastocitomi, le nostre attuali conoscenze in termini di incidenza e prevalenza, nonché di corretto inquadramento diagnostico e di definizione dello *staging* e del *grading* di questi tumori, risultano assai accresciute rispetto al passato, mentre ancora sconosciuta può in larga parte ritenersi la loro eziologia e non ancora del tutto univoci appaiono i criteri ed i parametri considerati in riferimento alla loro prognosi (Lepri et al., 2002 a).

Tuttavia alcuni casi, come quelli ascrivibili alle forme intestinali, più rare, presentano maggiori difficoltà interpretative riguardo ai relativi quadri istopatologici e qui diviene imperativo, come si dirà più approfonditamente in seguito, il ricorso ad un adeguato protocollo di indagini laboratoristiche volte ad una precisa definizione diagnostica dei casi in oggetto.

Dal punto di vista istogenetico, vista la cellula d'origine, il mastocitoma si può annoverare tra le neoplasie del tessuto connettivo. Colpisce quasi tutti i mammiferi domestici, sebbene il cane ed il gatto siano le specie maggiormente interessate (Jubb et al., 1993).

Nel cane il mastocitoma rappresenta, da solo, fino al 6% di tutte le neoplasie, e dal 13 al 20% di quelle cutanee (Jubb et al., 1993; Goldschmidt e Hendrick, 2002).

La localizzazione primaria più frequente è a livello di connettivo sottocutaneo, con possibilità di coinvolgimento dei linfonodi tributari e, meno comunemente, degli organi interni.

Più raramente sono stati descritti mastocitomi ad insorgenza primaria nasale e nasofaringea, laringea, tracheale (Goldschmidt e Hendrick, 2002), pancreatica ed intestinale (Jubb et al., 1993).

Nel gatto, il mastocitoma si manifesta meno frequentemente rispetto al cane (Goldschmidt e Hendrick, 2002), sebbene esso abbia una maggiore tendenza a coinvolgere primariamente gli organi interni. In quest'ultima specie si distinguono le seguenti tre forme: a) mastocitoma cutaneo; b) mastocitoma viscerale; c) mastocitoma cutaneo con mastocitosi viscerale (Jubb et al., 1993).

Una mastocitosi sistemica, indipendente dal mastocitoma cutaneo e dalla mastocitosi viscerale e con carattere leucemico (mastocitoleucemia), è stata inoltre descritta come un reperto lesivo raro nel gatto ed eccezionale nel cane. In tale forma si osserva un'infiltrazione di mastociti nel midollo osseo, nel sangue, nella milza e, in minor misura, a livello di fegato e linfonodi.

I mastocitomi colpiscono cani di ogni età, con maggiore incidenza nei soggetti di circa 8 anni, senza alcuna predisposizione di sesso, mentre sono particolarmente colpite le razze Boxer, Terriers, Bulldog e Labrador Retriever (Goldschmidt e Shofer, 1992).

La maggior parte dei gatti colpiti ha oltre 4 anni di età e non vi è predisposizione di sesso. La razza siamese, per contro, è quella più soggetta a sviluppare il mastocitoma, ivi compresa la variante istiocitaria (Goldschmidt e Hendrick, 2002).

I sintomi sono generalmente sovrapponibili a quelli osservati in presenza di un tumore cutaneo benigno e la massa neoplastica evolve molto lentamente nell'arco di diversi mesi.

Macroscopicamente, il mastocitoma nel cane si presenta come una placca o una massa nodulare, talvolta pedunculata, singola o multipla, in qualche caso edematosa, ulcerata o pigmentata e più frequentemente localizzata, a livello di tronco, perineo, scroto, inguine ed arti posteriori (Goldschmidt e Hendrick, 2002), mentre nel gatto tende a prevalere un interessamento diffuso a tutto il corpo, sebbene le principali localizzazioni siano a carico della testa, del collo e delle regioni del tronco, comunemente sotto forma di papule, placche o noduli cutanei dai limiti epidermici generalmente alopecici e arrossati (Goldschmidt e Hendrick, 2002).

La superficie di taglio della lesione appare solitamente di colorito bianco-grigiastro o marrone chiaro.

Istologicamente, i mastocitomi cutanei risultano costituiti da una popolazione di cellule neoplastiche diffuse oppure da una serie di lamine o cordoni fittamente stipati di cellule rotonde con nuclei centrali di forma tondeggianti, abbondanti citoplasmi granulari basofili e contorni cellulari indistinti (Jubb et al., 1993).

Altri aspetti istologici propri della neoplasia includono necrosi fibrinoide delle pareti vasali, vasculiti eosinofile o a cellule mononucleate, degenerazione delle fibre collagene e foci di necrosi (Scott et al., 2001).

I mastocitomi, comunque, sono caratterizzati da un'intrinseca variabilità in termini sia citologici, sia di velocità di accrescimento (Jubb et al., 1993).

In base al grado di differenziazione, i mastocitomi cutanei canini sono classificabili nelle seguenti tre categorie: grado I (ben differenziati), grado II (intermedi), grado III (scarsamente differenziati o anaplastici) (Patnaik et al., 1984).

Il tipo scarsamente differenziato (grado III) presenta un elevato grado di pleomorfismo cellulare, con nuclei grandi, irregolari, a loro volta contenenti da uno a tre nucleoli prominenti e con citoplasmi al cui interno si rinvengono pochi granuli metacromatici grandi o che appaiono, altresì, granulari e basofili. Le figure mitotiche sono spesso numerose e le cellule sono disposte in ampi ammassi.

Nel tipo ben differenziato (grado I), invece, le cellule sono di forma rotondeggiante od ovale, di dimensioni uniformi ed hanno limiti citoplasmatici ben distinti. I nuclei, rotondi e centrali, ospitano solitamente un singolo nucleolo, di ridotte dimensioni, mentre il citoplasma è abbondante e granulare e le figure mitotiche molto rare.

Nel gatto è descritta una forma infrequente, il sottotipo *istiocitario*, caratterizzata da aspetto istologico granulomatoso e da insorgenza più comune nella razza siamese (Scott et al., 2001).

Una caratteristica morfologica tanto comune quanto saliente del mastocitoma è inoltre rappresentata dall'infiltrazione eosinofila peritumorale (Jubb et al., 1993; Goldschmidt e Hendrick, 2002), dovuta all'azione chemiotattica che determinate sostanze chimiche prodotte dai mastociti (prima fra tutte l'istamina) esercitano sui granulociti eosinofili. Questi ultimi intervengono inattivando, attraverso meccanismi perlopiù di tipo enzimatico, parte dei mediatori chimici liberati dai mastociti.

In corso di mastocitomi disseminati, si osserva altresì con relativa frequenza la comparsa di ulcere gastroduodenali (sindromi paraneoplastiche) (Jubb et al., 1993; Goldschmidt e Hendrick, 2002), legate a stimolazione dei cd. "recettori H2" da parte dell'istamina, con conseguente aumento della secrezione acida e comparsa di fenomeni ischemici a carico della mucosa. Alcune di queste ulcere possono evolvere in maniera assai grave, con conseguente gastrorragia, mentre di ben più raro riscontro sarebbero altre sindromi paraneoplastiche, caratterizzate da shock ipotensivo o da fenomeni coagulopatici locali, a loro volta secondari al rilascio di mediatori prodotti dai mastociti, quali soprattutto istamina ed eparina (Jubb et al., 1993).

Le metastasi si verificano dapprima a carico dei linfonodi loco-regionali, quindi a livello di diversi organi e tessuti, fra cui soprattutto fegato, milza e midollo osseo (Jubb et al., 1993).

Le forme intestinali di mastocitoma (M.I.) non sono comuni e si manifestano con maggior frequenza nei soggetti anziani (Jubb et al., 1993). Nel cane, i mastocitomi di origine gastro-intestinale sono di più raro riscontro rispetto a quelli cutanei ed i loro aspetti morfo-patologici risultano tuttora poco chiari (Ozaki et al., 2002). Dette forme neoplastiche, osservate in razze canine nane, con particolare riferimento alla razza maltese, sono caratterizzate da masse tumorali a loro volta costituite da piccole cellule rotonde, in cui la maggior parte di queste presenta citoplasmi da moderati ad abbondanti e nuclei da tondi ad ovali, simili a quelli delle cellule linfomatose, mentre un piccolo numero

di esse contiene sparsi granuli metacromatici (Ozaki et al., 2002). Nell'ambito di una casistica di 39 mastocitomi del tratto gastrointestinale in altrettanti cani, Ozaki et al. (2002) hanno tentato di stabilire i criteri utili ai fini di una diagnosi definitiva di tale neoplasia, valutando la presenza o meno di metacromasia, nonché di immunopositività nei confronti sia del recettore c-kit, sia dell'enzima triptasi, unitamente alle caratteristiche ultrastrutturali della medesima. Il 77% ed il 62% di tali forme neoplastiche mostravano immunoreattività nei confronti rispettivamente del c-kit e della triptasi, con espressione del primo a livello di membrana cellulare e di citoplasma, espressione che diveniva esclusivamente citoplasmatica nel caso della triptasi (Ozaki et al., 2002).

Per quanto concerne la specie felina, un importante contributo al riguardo è quello prodotto da Alroy et al. (1975), i quali hanno osservato la massima incidenza, dei casi di M.I. ad un'età media pari a 12,3 anni, senza peraltro alcuna distinzione di razza e/o di sesso. In linea generale, i M.I. appaiono meno differenziati di quelli cutanei (Garner e Lingeman, 1970; Alroy et al., 1975; Jubb et al., 1993), essendo caratterizzati, nella specie felina, da un *pattern* istologico più pleomorfo (Alroy et al., 1975), con una maggiore tendenza delle lesioni a svilupparsi in corrispondenza del piccolo intestino (Alroy et al., 1975; Jubb et al., 1993; Marks, 2001).

I focolai neoplastici possono essere singoli o multipli, di diametro compreso tra 1 e 7 cm, sotto forma di ispessimenti segmentali dell'intestino, associandosi al tempo stesso ad una disseminazione linfo-ematogena diffusa, evenienza quest'ultima che comporta una prognosi infausta (Alroy et al., 1975; Jubb et al., 1993; Marks, 2001). Ciononostante, alcuni Autori hanno descritto occasionali casi di M.I. solitario nel gatto non caratterizzati da metastasi e con prognosi benigna (Withrow e MacEwen, 2001). A differenza di quelli viscerali splenici, i M.I. non si accompagnano a mastocitosi periferica, mentre sono comuni le metastasi ai linfonodi mesenterici, al fegato, alla milza, ai polmoni ed al midollo osseo (Alroy et al., 1975; Jubb et al., 1993; Marks, 2001) e la maggior parte degli animali viene a morte o viene sottoposta ad eutanasia poco dopo la diagnosi (Marks, 2001).

Le aree intestinali interessate sono colorate di bruno ed appaiono dure, ispessite e possono essere lunghe da uno a svariati centimetri (Jubb et al., 1993).

Istologicamente si apprezzano numerosi elementi di somiglianza rispetto ai carcinoidi, cosicché ai fini della diagnosi definitiva sono richieste una serie di indagini istochimiche ed ultrastrutturali (Jubb et al., 1993). Le tipiche modalità di presentazione del M.I. prevedono una serie di folti aggregati di mastociti pleomorfi, fittamente stipati gli uni agli altri ed organizzati ora sotto forma di cordoni, ora sotto forma di vortici che infiltrano la mucosa e le aree adiacenti della parete intestinale. Le cellule tumorali, differenti da quelle dei mastocitomi che interessano la cute ed altri organi, appaiono di forma poligonale e/o fusata, presentando al tempo stesso un citoplasma finemente granulare o vacuolato, con bordi citoplasmatici indistinti e nuclei eccentrici ed ipercromatici. Il grado di metacromasia varia considerevolmente da caso a caso e, nel contesto del parenchima neoplastico, si nota pure una marcata variabilità nel numero di eosinofili (Jubb et al., 1993).

Dal punto di vista ultrastrutturale, le cellule tumorali somigliano, per molti aspetti, ai tipici mastociti degranulati. Il citoplasma presenta numerose membrane associate a granuli, che appaiono come vescicole singole o fuse, contenenti a loro volta un fine materiale fibrillare lassamente organizzato. Alcuni elementi cellulari contengono granuli fibrillari elettroni-densi e forme intermedie. Nessuna delle cellule costituenti la neoplasia contiene, tuttavia, i caratteristici granuli cristallini elettroni-densi presenti nei normali mastociti, così come nei mastociti localizzati in altri distretti corporei (Jubb et al., 1993).

La comparsa di ulcere secondarie a carico della mucosa gastro-duodenale non è inoltre caratteristica del M.I. (Jubb et al., 1993), fenomeno quest'ultimo verosimilmente connesso ai ridotti livelli di istamina secreta ad opera delle cellule neoplastiche. A tal proposito, sono stati ottenuti convincenti dati morfologici ed istochimici a supporto della capacità, da parte dei mastociti gastro-intestinali, di sintetizzare ed immagazzinare una serie di mediatori chimici in quantità differenti rispetto a quelli elaborati dai mastociti residenti in altri distretti dell'economia animale.

In virtù di quanto sopra, appare più che lecito supporre che i M.I. possano presentare caratteristiche morfologiche e, soprattutto, un comportamento biologico assolutamente distinti da quelli dei mastocitomi riscontrati in altre sedi (Howl, 1995).

PARTE SPECIALE: CONTRIBUTO CASISTICO

Descrizione del caso: Segnalamento, rilievi clinico-strumentali ed anatomico-istopatologici

Il caso da noi osservato si riferisce ad un gatto europeo maschio, intero, di 11 anni di età, in discreto stato di nutrizione (4 kg di peso), allevato allo stato semilibero, mai sottoposto a trattamenti antiparassitari né a vaccinazioni, affetto da rinotracheite cronica e condotto a visita per diarrea intermittente presente da circa una settimana.

All'esame obiettivo particolare dell'apparato digerente si rilevava la presenza di una formazione nodulare-nodosa a livello intestinale.

L'animale è stato sottoposto ad esami ematologici e delle urine, ad esame radiografico del torace ed ecografico dell'addome che, oltre a rilevare la stessa lesione già riscontrata alla palpazione, ha consentito il contestuale apprezzamento di un'area iperecogena a livello del lobo sinistro mediale del fegato, del diametro di circa 2 mm. Le dimensioni della lesione e la sua localizzazione hanno scoraggiato l'attuazione di una biopsia ecoguidata con ago sottile.

Il soggetto in questione, inoltre, presentava sieropositività al test ELISA nei confronti dell'infezione da virus dell'immunodeficienza felina ("*feline immunodeficiency virus*", FIV).

Sono state eseguite una laparotomia esplorativa ed un'enterectomia, con circa 3 cm di intestino sano per lato e successiva anastomosi, a livello del tratto interessato dalla lesione (digiuno).

In sede chirurgica, la lesione epatica appariva macroscopicamente d'aspetto nodulare, di colorito biancastro e di diametro pressoché sovrapponibile a quello riscontrato in

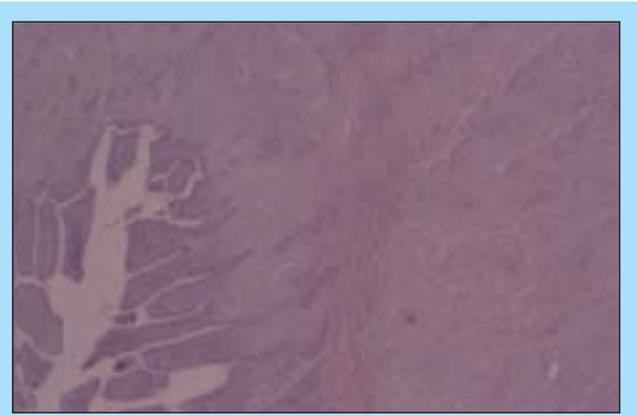


FIGURA 1 - Gatto. Intestino (digiuno). Mastocitoma intestinale. Estesa e diffusa infiltrazione neoplastica a carico della sottomucosa e della muscolaris mucosae (E.E. Ob. 4X).

sede ecografia e si è preferito rinunciare alla lobectomia epatica, mentre i linfonodi loco-regionali non si presentavano aumentati di volume, né tantomeno interessati da alcun tipo di lesione macroscopicamente apprezzabile.

Una volta effettuata l'asportazione chirurgica, il campione tissutale in oggetto è stato immediatamente fissato in soluzione di formalina neutra tamponata al 10%.

Nessuna complicazione si è presentata nel periodo post-chirurgico e a 7 giorni dall'intervento il gatto era clinicamente normale, con risoluzione completa della diarrea.

I caratteri macroscopici della lesione si riassumevano nella presenza di una massa neoformata tondeggianti, di colorito biancastro e di consistenza lardacea, che avvolgeva a mo' di manicotto, stenosandone il lume, il tratto intestinale in questione.

Dopo fissazione in formalina, il reperto biotico è stato incluso in paraffina, sezionato ad uno spessore di 5 µm e colorato, come di routine, con ematossilina-eosina (E.E.) ai fini delle relative indagini al microscopio ottico.

Dal punto di vista istopatologico, le lesioni si caratterizzavano, oltre che per la presenza di un'enterite linfoplasmacellulare cronica, anche per un'estesa e diffusa infiltrazione neoplastica della tonaca muscolare e della sottomucosa intestinale (Fig. 1). Il parenchima tumorale in oggetto risultava costituito da densi ammassi di cellule rotondo-polygonali e fusate, fittamente stipati gli uni agli altri, frammentati ai quali si apprezzavano granulociti eosinofili singoli o riuniti in piccoli gruppi. Gli elementi neoplastici, contraddistinti da indice cariocinetico alquanto contenuto, si rinvenivano variamente organizzati in vortici ed in cordoni tra i fasci della tonaca muscolare, spingendosi in alcuni punti fino ad invadere e superare, distruggendola, la *muscolaris mucosae*, con conseguente colonizzazione anche della mucosa.

Ulteriori reperti istolesivi erano costituiti dalla presenza di aree di collagenolisi intratumorale, mentre una più o meno delicata trama fibro-reticolo-connettivale, associata a fenomeni di neoangiogenesi capillaro-vasale intratumorale ed alla presenza di aggregati linfoidi peri-endotumoralis (Fig. 8), erano contestualmente apprezzabili.

Gli elementi neoplastici inoltre, d'aspetto perlopiù vescicoloso, contenevano singoli nuclei centrali, meno frequentemente eccentrici.

Dal punto di vista diagnostico-differenziale, sulla base dei suddetti reperti istolesivi, si è ritenuto opportuno considerare le seguenti forme neoplastiche: leiomioma, leiomiomasarcoma, emangiopericitoma (peraltro mai descritto nella specie felina), schwannoma, carcinoide e mastocitoma.

Indagini istochimiche, immunohistochemiche ed ultrastrutturali: Materiali e metodi

È stato pertanto elaborato e messo a punto, allo scopo di poter pervenire ad una diagnosi definitiva, un adeguato protocollo di indagini istochimiche, immunohistochemiche ed ultrastrutturali.

Per quanto riguarda le prime, sono state eseguite le seguenti colorazioni: blue di toluidina, Giemsa, PAS (con e senza pretrattamento a base di diastasi), ematossilina acida fosfotungstica (PTAH) di Mallory, colorazione tricromica di Masson, Luxol fast blue e Grimelius.

La caratterizzazione immunohistochemica delle lesioni si è invece basata sull'impiego dei seguenti anticorpi (Abs) monoclonali e policlonali: Abs monoclonali anti-calponina (clone CALP), anti-actina del muscolo liscio (SMA) (clone 1A4), anti-enolasi neurone-specifica (NSE) (clone BBS/NC/VI-H14), anti-vimentina (clone V) ed anti-triptasi (clone AA1) (DAKO®); Abs policlonali anti-fattore VIIIb (vWF) (DAKO®) ed anti-alpha-1-antitripsina (NOVOcastra®), utilizzati alle diluizioni suggerite dalle aziende produttrici. L'inibizione delle perossidasi endogene è stata ottenuta mediante pre-trattamento delle sezioni con una soluzione al 3% di perossido di idrogeno e metanolo. Lo smascheramento dei diversi siti antigenici è stato effettuato con *Pronase XIV* (Sigma®), tranne che per l'Ab anti-vWF, dove sono stati impiegati 3 cicli da 5 minuti ciascuno in forno a microonde a 750 Watt, e l'Ab anti-alpha-1-antitripsina per il quale si è utilizzata la tripsina (Sigma® *Trypsin*). Come sistema rivelatore è stato utilizzato il complesso streptavidina-biotina-perossidasi (BIOSPA®), mentre come cromogeno la DAB (Sigma®) e come colorazione di contrasto il blue di toluidina per il solo antigene vWF e l'ematossilina di Papanicolau (MERCK®) per gli altri antigeni.

Per le indagini ultrastrutturali, la metodologia impiegata è stata la seguente: lavaggio con tampone cacodilato (pH 7,2; 0,1 M), fissazione dapprima in glutaraldeide al 2,5% per 2h, quindi in tetrossido di osmio all'1% (pH 7,2; 0,1 M) per 1h, inclusione in resina epossidica *Durcupan ACM* (Fluka®), effettuazione di sezioni semifini ed ultrafini all'ultramicrotomo ed esame delle sezioni ottenute al microscopio ottico (sezioni semifini) ed al microscopio elettronico a trasmissione (sezioni ultrafini).

Indagini istochimiche, immunohistochemiche ed ultrastrutturali: Risultati

Sotto il profilo istochimico, la colorazione con il blue di toluidina non consentiva la dimostrazione di una metacromasia diffusa all'interno della popolazione di cellule tumorali, ma questa si limitava piuttosto alla presenza di singoli o sporadici mastociti che, all'interno di numerosi foci neo-

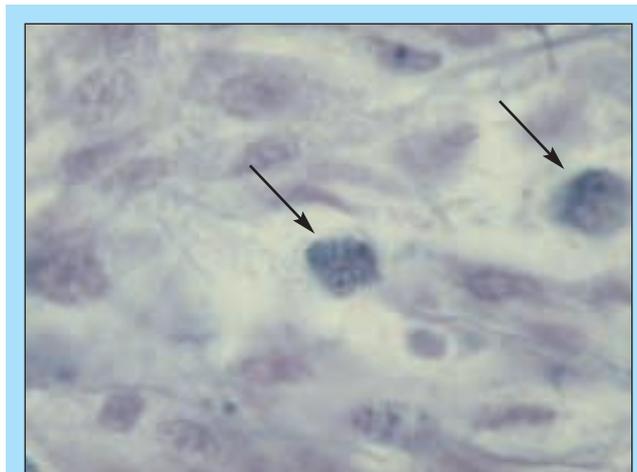


FIGURA 2 - Gatto. Intestino (digiuno). Mastocitoma intestinale. Particolare di alcune cellule neoplastiche, il cui citoplasma presenta aspetto perlopiù vescicoso. Sono altresì visibili 2 elementi cellulari binucleati, con il citoplasma ripieno di granuli, riferibili a granulociti eosinofili (freccie) (Giemsa, Ob.100X).

plastici, mostravano i caratteristici granuli citoplasmatici metacromatici. Con la tecnica di Giemsa, le cellule tumorali apparivano caratterizzate da citoplasmici perlopiù vesciculosi, mentre in alcuni di questi elementi erano chiaramente riconoscibili citoplasmici intensamente colorati in rosso-porpora; all'interno della popolazione neoplastica si osservavano, altresì, numerose cellule binucleate (granulociti eosinofili) (Fig. 2). Le sezioni tissutali colorate con metodica PAS (con e senza pretrattamento a base di diastasi) (Figg. 3 e 4) presentavano una debole, pur se pressoché costante, positività citoplasmatica, con numerose cellule che sfumavano verso il rosso magenta. La colorazione con la PTAH di Mallory consentiva inoltre di meglio documentare la presenza di granuli nel citoplasma degli eosinofili che, più o meno numerosi, si associavano ai vari aggregati di elementi neoplastici (Fig. 5); con il metodo tricromico di Masson, infine, si rendeva evidente una più o meno esile trama fibro-reticolo-connettivale che contornava e diffusamente infiltrava, al tempo stesso, l'intero parenchima tumorale (Figg. 6 e 7).

La chiara negatività delle cellule neoplastiche nei confronti della colorazione Luxol-Fast-Blue ci ha permesso di escludere un tumore delle cellule di Schwann (schwannoma); la negatività alla colorazione di Grimelius ci ha invece consentito di escludere la presenza di un tumore originante dalle cellule entero-cromaffini (carcinoide) (Tab. 1).

Per quanto riguarda le indagini immunohistochemiche effettuate, i risultati sono riassunti nella Tabella 2.

Da segnalare, in proposito, l'immunoreattività delle cellule tumorali nei confronti della vimentina e della triptasi.

Ultrastrutturalmente, le cellule tumorali mostravano l'aspetto di tipici mastociti degranulati o pauci-granulati, con contestuale presenza di una serie di vescicole citoplasmatiche spesso coalescenti, vuote o con pochi granuli od esili fibrille al loro interno. Frammisti ai suddetti elementi cellulari, se ne potevano notare altri, caratterizzati a loro volta da nuclei bilobati e citoplasmici contenenti caratteristici granuli elettrondensi (granulociti eosinofili) (Fig. 9).

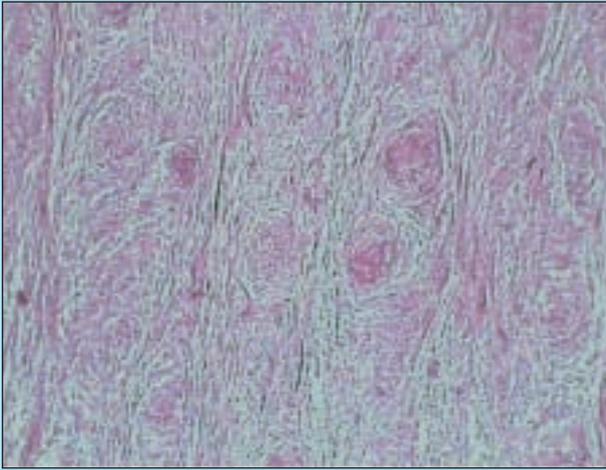


FIGURA 3 - Gatto. Intestino (digiuno). Mastocitoma intestinale. Presenza di folti aggregati di elementi neoplastici PAS positivi organizzati in vortici e cordoni (PAS, Ob. 10X).

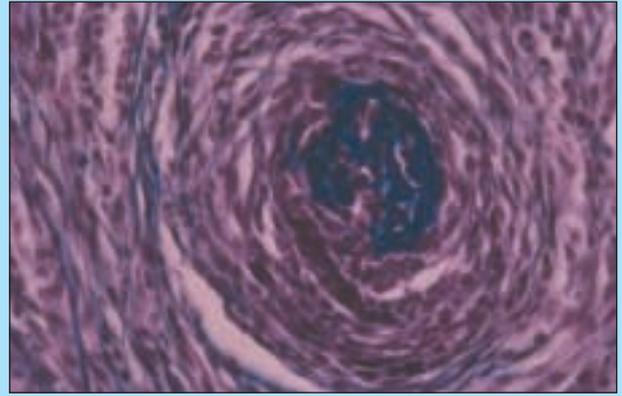


FIGURA 6 - Gatto. Intestino (digiuno). Mastocitoma intestinale. Presenza di un'evidente area di collagenolisi intratumorale (Masson, Ob. 25X).

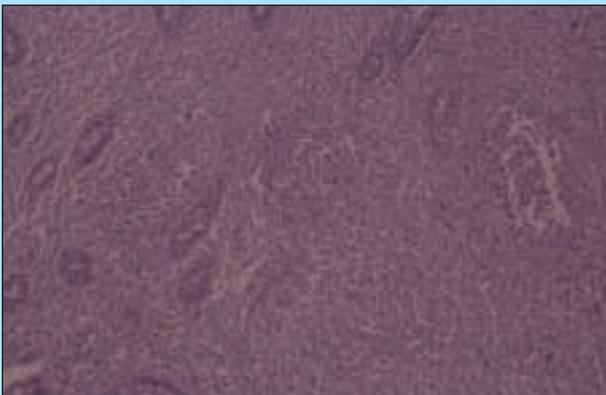


FIGURA 4 - Gatto. Intestino (digiuno). Mastocitoma intestinale. La popolazione di cellule neoplastiche, che invade e supera la muscolaris mucosae, con conseguente colonizzazione della sovrastante mucosa, appare debolmente PAS-positiva (PAS, Ob. 10X).

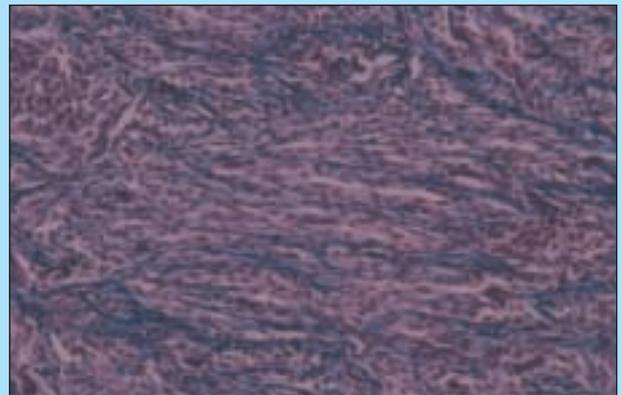


FIGURA 7 - Gatto. Intestino (digiuno). Mastocitoma intestinale. Presenza di una trama fibro-reticulo-connettivale all'interno del parenchima tumorale (Masson, Ob. 10X).



FIGURA 5 - Gatto. Intestino (digiuno). Mastocitoma intestinale. Piccolo gruppo di granulociti eosinofili (freccia) frammisti a cellule neoplastiche (PTAH, Ob. 100X).

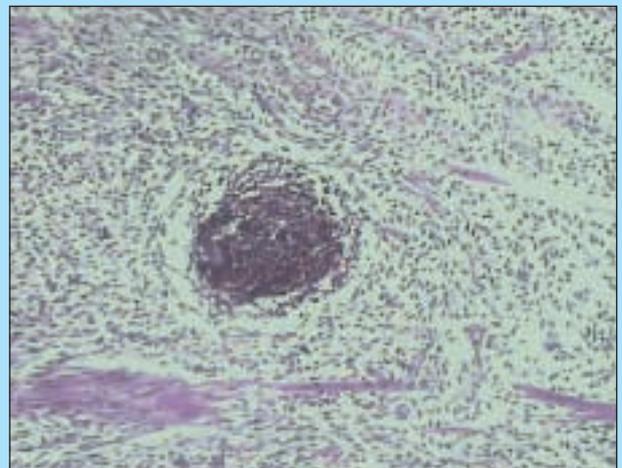


FIGURA 8 - Gatto. Intestino (digiuno). Mastocitoma intestinale. Presenza di un folto aggregato linfoide in sede intratumorale (E.E., Ob. 4X).

Tabella 1

Risultati delle indagini istochimiche effettuate sul tumore in oggetto

Metodica istochimica	Risultati
Blue di Toluidina	+/-
Giemsa	+/-
PAS	+
PTAH	-
Luxol-Fast-Blue	-
Grimelius	-

Legenda: + positività alla colorazione;
- negatività alla colorazione;
+/- positività incostante alla colorazione.

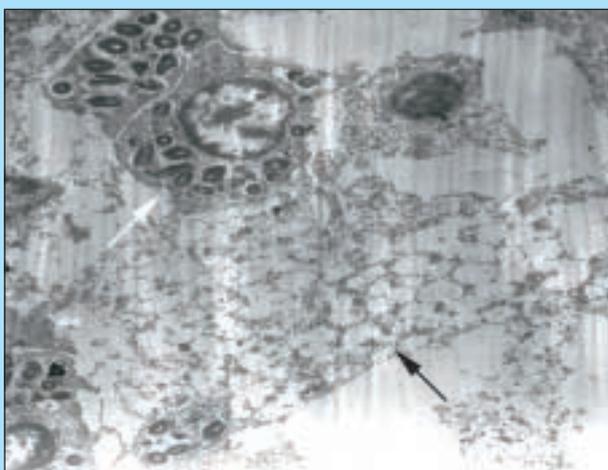


FIGURA 9 - Gatto. Intestino (digiuno). Mastocitoma intestinale. Morfologia ultrastrutturale delle lesioni. Si apprezzano alcuni mastociti degranulati, caratterizzati da vescicole citoplasmatiche vuote o con scarso contenuto granulare (freccia nera), circondati a loro volta da alcuni granulociti eosinofili con i caratteristici granuli elettrondensi (freccia bianca) (TEM, acetato di uranile e citrato di Pb, Ob. 4400X).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I suddetti reperti immunoistochimici hanno consentito di differenziare la neoplasia in questione dai tumori delle cellule muscolari lisce (negatività alla SMA ed alla calponina), così come dagli emangiopericitomi e dagli schwannomi (negatività alla NSE), mentre la stessa, in accordo con quanto descritto da altri Autori (Fondevila et al., 1990; Ozaki et al., 2002), è stata definitivamente ascritta, in ragione dell'immunopositività delle cellule tumorali alla vimentina ed alla triptasi, nonché dei caratteristici reperti ultrastrutturali, ad un mastocitoma intestinale (M.I.).

Tuttavia, nel caso oggetto della presente segnalazione, ci siamo confrontati fin dall'inizio con il notevole "handicap" determinato dall'avvenuta fissazione dei campioni biotici prelevati in sede chirurgica in fissativi non del tutto idonei ai fini della caratterizzazione istologica, istochimica ed ultrastrutturale di un M.I. A riprova di ciò, infatti, i mastociti mucosali residenti nell'intestino umano presenterebbero, in corso di biopsie fissate in formalina,

un "fondo" di colorazione con il blue di toluidina e con l'astrablue/safranina acida più marcato rispetto a quello ottenuto in campioni tissutali fissati in Carnoy o in acetato basico di Pb (fissativo di Mota), in cui i mastociti risulterebbero peraltro assai meglio preservati rispetto ai primi (Strobel et al., 1981).

Le stesse considerazioni trovano riscontro anche rispetto al fenomeno della metacromasia, che si renderebbe ben più evidente solo a seguito di fissazione in Carnoy (Noli e Miolo, 2001).

Analogamente, anche ai fini di una più efficace dimostrazione istochimica della chimasi presente nei mastociti, con particolare riferimento a quelli intestinali, attraverso il metodo della cloroacetato esterasi (CAE), si è rivelata necessaria la fissazione in acetato basico di Pb, in paraformaldeide al 4% o in fissativo di Carnoy (almeno nel ratto, topo, ovino, cane e uomo) (Huntley et al., 1985; Kube et al., 1998), anche se altri Autori ritengono più marginale il ruolo del fissativo impiegato in partenza (Auxilia, 2000). Al di là di ciò, comunque, i M.I. felini sarebbero CAE-negativi, almeno secondo alcuni studiosi (Lepri et al., 2002b).

Nel nostro caso, inoltre, bisogna parimenti segnalare che non c'è stata la possibilità di osservare impronte a fresco del tumore che, in accordo con diversi Autori (Garner e Lingeman, 1970; Alroy et al., 1975), sarebbero state di grande valenza ed utilità diagnostica.

Sebbene l'intenzione di effettuare un esame istopatologico abbia indotto il clinico a soprassedere dall'effettuare un'indagine citologica intraoperatoria, nella fattispecie uno striscio a fresco avrebbe consentito di evidenziare la metacromasia delle cellule con maggiore facilità rispetto ad un campione fissato ed incluso, i cui limiti sono già stati commentati precedentemente.

Il M.I., oltre ad essere una condizione neoplastica di raro riscontro nella specie felina, condivide una serie di aspetti morfologici con altri tumori intestinali ed extra-intestinali, quali ad esempio i carcinoidi e gli emangiopericitomi (questi ultimi, peraltro, mai segnalati nel gatto), rispetto ai quali l'utilizzo delle suddette tecniche di fissazione (Carnoy), così come l'effettuazione di impronte a fresco del tumore possono rivelarsi appunto di notevole ausilio sul piano diagnostico-differenziale.

Di particolare interesse risulta pure la biologia del mastocita intestinale, cellula con caratteristiche biochimico-funzionali diverse dal c.d. "mastocita connettivale". A riprova di queste sostanziali differenze comportamentali ed in aggiunta alla documentata assenza di sindromi paraneoplastiche in corso di M.I., vi sono stati, nel nostro caso, i reperti di fibroplasia reticolo-connettivale e di neo-angiogenesi capillaro-vasale che, anche se potenzialmente giustificabili – almeno per quanto concerne la fibroplasia – attraverso l'intervento dell'istamina, rappresenterebbero il prodotto del rilascio, da parte dei mastociti, di tutta una serie di citochine fibro-plaseogene (TNF- α , IL-1, IL-4), nonché di triptasi e di alcuni fattori di crescita (FGF- β , TGF), sostanze tutte in grado di influenzare, a vario titolo, la chemiotassi, la migrazione, la differenziazione fenotipica e l'attività biosintetica dei fibroblasti e delle cellule endoteliali, promuovendo la sintesi del collagene e l'attivazione di numerosi enzimi coinvolti nel rimodellamento della matrice (Noli e Miolo, 2001).

Un ulteriore aspetto particolarmente meritevole di interesse e di approfondimento attiene agli eventuali rapporti eziopatogenetici intercorrenti fra insorgenza della condizione neoplastica in oggetto, da un lato, ed infezione da FIV, dall'altro, visto e considerato che quest'ultima era stata sierologicamente accertata nel gatto in esame.

Degna di nota appare, al riguardo, la segnalazione congiunta di un mastocitoma disseminato, cutaneo e viscerale, e di un linfosarcoma spinale in un gatto FIV-positivo, avvenuta 10 anni or sono ad opera di Barr et al. (1993).

Inoltre, già alcuni anni prima, un mastocitoma cutaneo disseminato era stato descritto in 1 su 28 gatti FIV-infetti, a loro volta inclusi in un gruppo di studio di 587 felini, così come in un altro soggetto FIV-positivo, quest'ultimo facente parte di un'altra indagine (Shelton et al., 1989).

Pertanto, anche i mastocitomi possono rappresentare una delle condizioni neoplastiche osservate in gatti con infezione da FIV, seppure con frequenza decisamente più ridotta rispetto ai linfomi ed ai carcinomi squamo-cellulari (Barr et al., 1993).

Per quanto più strettamente concerne il ruolo oncogeno, diretto o indiretto, eventualmente esplicato dal FIV in corso di mastocitoma felino, dai pochi dati disponibili in letteratura sull'argomento si evincerebbe un'azione per lo più indiretta, anche se una specifica attività replicativa virale è stata documentata in colture di cellule spleniche ottenute da gatti con mastocitoma viscerale disseminato (Terry et al., 1995).

Al di là di ciò, appare tuttavia plausibile che solo una piccola frazione delle cellule neoplastiche o dei linfociti infiltranti il parenchima tumorale possa efficacemente supportare la replicazione dell'agente virale, cosicché l'ipotesi più valida ed accreditata sarebbe quella secondo cui il virus giocherebbe un ruolo oncogeno indiretto, presumibilmente mediato attraverso una compromissione dei meccanismi che presiedono alla c.d. "sorveglianza immunologica" (Barr et al., 1993).

Nel caso oggetto della presente descrizione, va comunque precisato che le indagini ultrastrutturali al TEM non hanno evidenziato strutture riferibili ad eventuali particelle virali nelle sedi di lesione.

Inoltre, i controlli clinici condotti a quattro, dieci e sedici mesi dall'intervento chirurgico hanno rivelato sempre che il soggetto godeva di buona salute, dato quest'ultimo che è risultato ogni volta pienamente confermato da una serie di parametri laboratoristici tutti nella norma. D'altra parte, anche le diverse indagini strumentali eseguite nel tempo non hanno consentito l'accertamento di eventuali metastasi, nonostante sia stato nel frattempo documentato un aumento di volume, pari a circa 4 mm, a carico della lesione epatica più sopra descritta, mai peraltro sottoposta in seguito ad exéresi chirurgica sia per l'età dell'animale, sia per espressa volontà del proprietario. Questa condizione, associata alla mancata esecuzione di una biopsia ecoguidata ed alla mancata escissione in corso di exéresi della massa intestinale, approcci in assoluto corretti, ma purtroppo non sempre effettuabili, hanno fatto sì che non sia stato possibile determinare la natura di tale massa.

Peraltro, dopo circa due anni dall'intervento, il gatto, che non presentava alcun sintomo clinico di malattia, non è più tornato a casa.

Tabella 2
Risultati delle indagini immunohistochimiche effettuate sul tumore in oggetto mediante l'utilizzo di un pannello di anticorpi (Abs) monoclonali e policlonali

Abs utilizzati	Risultati
SMA	-
Calponina	-
Vimentina	+
NSE	-
vWF	-
Triptasi	+
Alpha-1-antitripsina	-

Legenda: + positività all'Ab;
- negatività all'Ab.

In conclusione, il caso di M.I. felino oggetto della presente nota ci sembra del tutto compatibile, sotto il profilo sia del comportamento biologico, sia di quello clinico-patologico, con uno degli occasionali reperti di "M.I. solitario" del gatto già descritti da Withrow e MacEwen (2001), in cui i tempi di sopravvivenza successivi all'asportazione chirurgica della lesione risulterebbero solitamente lunghi.

Un altro importante aspetto che ci preme sottolineare, al di là della rarità e del peculiare comportamento biologico e clinico-patologico della neoplasia, risiede infine nelle intrinseche difficoltà diagnostiche poste dalla medesima, difficoltà che giustificano appieno la necessità di una stretta opera di collaborazione fra clinico e patologo, quest'ultima tanto più valida e fruttuosa quando ci si confronti con situazioni morbose poco frequenti e caratterizzate al tempo stesso, come nella fattispecie, da molteplici lacune conoscitive.

Parole chiave

Mastocita, mastocitoma, mastocitoma intestinale, gatto, immunohistochimica.

Key words

Mast cell, mast cell tumour, intestinal mast cell tumour, cat, immunohistochemistry.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dott. Marco Colaceci, libero professionista, Roma, per aver sottoposto alla nostra attenzione l'interessante caso clinico qui riportato.

Bibliografia

- Foremann J. C. (1993), citato da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
- Dellmann H. D., Brown E. M. (1981). *Textbook of Veterinary Histology*. Edizione italiana a cura di Bortolami R. e Lucchi M. L. (1981), Editoriale Grasso, Bologna, p. 56.

3. Monesi V. (1992). *Istologia*, 4° Ediz., Piccin Editore, Padova, pp. 535-540.
4. Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
5. Kitamura Y., Shimada M., Hatanaka K., Miyano Y. (1977), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
6. Williams D. E., Eisenman J., Baird A., et al. (1990), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
7. Flanagan J. G., Leder P. (1990), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
8. Yarden Y., Kwang W. J., Yang-Feng T., et al. (1987), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
9. Qiu F., Ray P., Brown K., et al. (1988), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
10. Ihle J. N., Keller J., Oroszlan S. et al., (1983), citati da Hill P. B., Martin R. J., (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
11. Smith C. A., Renwick D. M. (1986), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
12. Schmitt E., Fassbender B., Beyreuther K., Spaeth E., Schwarzkopf R., Rude E. (1987), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
13. Hultner L., Moeller J., Schmitt E., et al. (1989), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology*, 9: 145-166.
14. Moeller J., Hultner L., Schmitt E., Dormer P. (1989), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
15. Tsuji K., Nakahata T., Takagi M., et al. (1990), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
16. Hultner L., Druetz C., Moeller J., et al. (1990), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9:145-166.
17. Thompson-Snipes L. A., Dhar V., Bond M. W., Mosmann T. R., More K. W., Rennick D. M. (1991), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
18. Aloe L., Levi Montalcini R. (1977), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
19. Broide D. H., Wasserman S. I., Alvaro-Garcia J., Zvaifer N. J., Firestein G.S. (1989), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
20. Nafziger J., Arock M., Guillosson J. J., Wietzerbin J. (1990), citati da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
21. Enerback L. (1966 a) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 66: 289-302.
22. Noli C., Miolo A. (2001). Role of the mast cell in the different stages of the wound healing process. *Veterinary Dermatology* 12: 303-313.
23. Enerback L. (1966 b) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. II. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*. 66: 303-312.
24. Enerback L. (1966 c), citato da Hill P. B., Martin R. J. (1998). A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 9: 145-166.
25. Marcato P. S. (1997). *Anatomia e Istologia Patologica Generale*, 3ª Ediz., Esculapio, Bologna, pp. 734-747.
26. Fox C. C., Jewell S. D., Whitacre C. C. (1994). Rat peritoneal mast cells present antigen to a PPD-specific T cell line. *Cell Immunol.* 158 (1): 253-264.
27. Mudde G. C., Bheekha R., Bruijnzeel-Koomen C. A. (1995). IgE-mediated antigen presentation. *Allergy* 50 (3): 193-199.
28. Frandji P., Tkaczyc C., Oskeritziyan C., David B., Desaymard C., Mecheri S. (1996). Exogenous and endogenous antigens are differentially presented by mast cells to CD4+ lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 26 (10): 2517-2528.
29. Tkaczyc C., Viguier M., Boutin Y., Frandji P., David B., Hebert J., Mecheri S. (1998). Specific antigen targeting to surface IgE and IgG on mouse bone marrow-derived mast cells enhances efficiency of antigen presentation. *Immunology* 94 (3): 318-324.
30. Malaviya R., Abram S. N. (2001). Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol. Rev.* 179: 16-24.
31. Lepri E., Ricci G., Leonardi L., Sforza M., Mechelli L. (2002 a). Indagine retrospettiva su 40 casi di mastocitoma cutaneo felino: Aspetti diagnostici e prognostici. *Atti LVI Congresso Nazionale SISVET*, pp. 145-146.
32. Jubb K. V. F., Kennedy P. C., Palmer N. (1993). *Pathology of Domestic Animals*. Academic Press, Inc., 4th Ed., Vol. 1, pp. 727-729; Vol. 2, p.139.
33. Goldschmidt M. H., Hendrick M. J. (2002) Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: *Tumors in Domestic Animals*, D.J. Meuten Editor, Fourth Ed., Iowa State Press, pp. 105-109.
34. Goldschmidt M. H., Shofer F. S. (1992). *Skin Tumors of the Dog and Cat*, 1st Ed., Pergamon Press, pp. 231-251.
35. Scott D. W., Miller W. H., Griffin C. E. (2001). *Small animal dermatology*, 6th Ed., W. B. Saunders Company, pp. 1320- 1330.
36. Patnaik A. K., Ehler W. J., MacEwen E. G. (1984). Canine cutaneous mast cell tumor: Morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.* 21 (5): 469-474.
37. Ozaki K., Yamagami T., Nomura K., Narama I. (2002). Mast Cell Tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 Dogs. *Vet. Pathol.* 39: 557-564.
38. Alroy J., Leav I., De Lellis R. A., Weinstein R. S. (1975). Distinctive intestinal mast cell neoplasms of domestic cats. *Laboratory Investigation* 33 (2): 159-168.
39. Garner F. M., Lingeman C. H. (1970). Mast-cell neoplasms of the domestic cat. *Path. Vet.* 7: 517-530.
40. Marks S. I. (2001). Aggiornamenti sulle neoplasie gastroenteriche del gatto. *Medicina Felina* 1: 27-30.
41. Withrow S. J., MacEwen E.G. (2001). *Small Animal Clinical Oncology*, 3rd Ed., W. B. Saunders Company, pp. 274-279.
42. Howl J. H., Petersen M. G. (1995). Intestinal mast cell tumor in a cat: Presentation as eosinophilic enteritis. *Journal of the American Animal Hospital Association* 31: 457-461.
43. Fondevila D., Rabanal R., Ferrer L. (1990). Immunoreactivity of canine and feline mast cell tumors. *Schweiz. Arch. Tierheilk* 132: 426.
44. Strobel S., Miller H. R. P., Ferguson A. (1981). Human intestinal mucosal mast-cells: Evaluation of fixation and staining techniques. *J. Clin. Pathol.* 34: 851-858.
45. Huntley J. F., Newlands G. F. J., Gibson S. (1985). Histochemical demonstration of chymotrypsin-like serine esterases in mucosal mast cells in four species including man. *J. Clin. Pathol.* 38: 375-384.
46. Kube P., Audigé L., Küther K., Welle M. (1998). Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. *Histochem. Cell Biol.* 110: 129-135.
47. Auxilia S.T., Hill P. B. (2000). Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: Possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? *Veterinary Dermatology* 11: 247-254.
48. Lepri E., Mandara M.T., Leonardi L., Vitellozzi G. (2002 b) Tryptase immunohistochemistry of feline mast cell tumors: Application and comparison with other staining techniques. *Proceedings of 20th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology*, p.116.
49. Barr M. C., Butt M. T., Anderson K. L., Lin D., Kelleher T. F., Scott F. W. (1993). Spinal lymphosarcoma and disseminated mastocytoma associated with feline immunodeficiency virus infection in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 12: 1978-1980.
50. Shelton G. H., Waltier R. M., Connor S. C., Grant C. K. (1989). Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in pet cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 25: 7-12.
51. Terry A., Callanan J. J., Fulton R., Jarrett O., Neil J. C. (1995). Molecular analysis of tumours from feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats: An indirect role for FIV? *Int. J. Cancer* 61: 227-232.