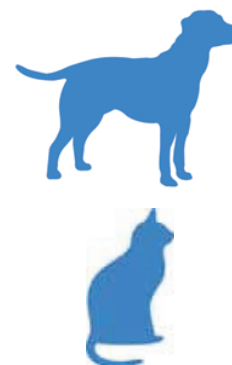


Patologia delle neoplasie mammarie della cagna e della gatta: stato dell'arte



Questo articolo espone le maggiori novità in merito all'oncologia istopatologica mammaria veterinaria prontamente applicabili alla diagnostica dei tumori mammarici nel cane e nel gatto, concentrandosi in particolare su quelle acquisizioni utili nella pratica clinica. Verranno descritti gli aggiornamenti riguardanti la classificazione istologica morfologica, i nuovi metodi proposti per il grading istologico dei carcinomi della cagna e della gatta e, infine, le ultime acquisizioni riguardanti l'applicazione del sistema di classificazione fenotipica su base molecolare, già convalidato per il cancro al seno.

INTRODUZIONE

I tumori mammarici si posizionano nei primi 3 posti tra i tumori più comuni nella cagna e nella gatta e per questo, nelle ultime decadi, sono stati oggetto di intensa ricerca da parte di patologi e oncologi.^{1,2,3,4} L'incidenza geografica del tumore mammarico varia a seconda della diffusione o meno della pratica di castrazione precoce.^{1,5} È infatti assodato il ruolo di promozione neoplastica, almeno iniziale, che rivestono gli ormoni ovarici^{4,6} e per tale motivo l'ovariectomia precoce riduce fortemente il rischio di insorgenza del tumore mammarico nella cagna e nella gatta.^{4,6,7,8} Varie differenze caratterizzano i tumori mammarici nelle due specie: nella cagna si ha un rapporto tra tumori benigni e maligni, di poco a favore dei tumori maligni⁴, nella gatta invece predominano le forme maligne diagnosticate in quasi il 90% dei casi.⁶ Anche dal punto di vista istologico si presentano in modo nettamente diverso: il tumore mammarico maligno più riscontrato nella cagna è il carcinoma complesso, nella gatta invece l'entità maligna più rappresentata è il carcinoma tubulo-papillare semplice; inoltre la diffusione metastatica della neoplasia è più comune in questa seconda specie.^{1,2} Mediante la caratterizzazione del fenotipo molecolare, sono recentemente emerse altre importanti differenze tra le due specie di interesse veterinario, che verranno approfondite più avanti nel testo.

Il trattamento dei tumori mammarici è ancora prevalentemente chirurgico: il tessuto asportato, subito la fissazione in formalina, è sottoposto alla consueta processazione in laboratorio che prevede l'inclusione in paraffina e la colorazione di sezioni tagliate al microtomo con ematossilina ed eosina. Viene così reso disponibile per la valutazione da parte del patologo, che ha l'onere di inquadrare la lesione dal punto di vista della classificazione istologica e di fornire altri elementi utili per una stima della prognosi e, se possibile, per impostare un protocollo terapeutico.^{9,10} Il referto istologico può infatti fornire al clinico oltre alla diagnosi di istotipo, altre informazioni finalizzate alla formulazione della prognosi della neoplasia in questione.¹¹



Michela Levi*
Med Vet,
PhD student



Giuseppe Sarli
Med Vet



Cinzia Benazzi
Med Vet,
Dipl. ECVP



Barbara Brunetti
Med Vet, PhD,
Dipl. ECVP

L'esame citologico di neoplasie mammarie è considerato poco costoso e facilmente eseguibile. Alcuni lo raccomandano per distinguere, prima dell'intervento chirurgico, masse benigne da quelle maligne, un carcinoma mammario di tipo infiammatorio da una mastite, tumori diversi da quello mammario (ad esempio mastocitomi) e lesioni non neoplastiche.⁵ Nonostante ciò lo studio di Cassali e coll. (2007)¹² ha sottolineato come un preparato citologico su 4 nella cagna sia inadeguato, quindi non possieda valore diagnostico, frequentemente a causa di ipocellularità dello striscio, nonché a causa di campionamento tecnicamente inadeguato oppure per caratteristiche intrinseche del tumore (presenza di necrosi, di matrice osteocartilaginea).¹² La valutazione di un campione adeguato può permettere di distinguere tra lesioni benigne o maligne, tuttavia il significato da attribuire a tale distinzione è diverso tra le due specie: nella cagna, basandosi sull'esame di agoaspirati di neoplasie mammarie, le lesioni maligne vengono frequentemente sottostimate, poiché, tipicamente in questa specie, coesistono lesioni benigne adiacenti a lesioni maligne focali.⁷ Pertanto nella cagna il responso di lesione benigna non esclude

La valutazione dei margini di escissione chirurgica è un importante parametro prognostico. L'esame citologico viene indicato da alcuni per distinguere, prima della chirurgia, masse benigne da quelle maligne ma, in particolare nella cagna, presenta notevoli insidie nell'interpretazione.

la presenza di lesioni maligne poco rappresentate e non campionate.⁷ Nella gatta, invece, dove la proliferazione neoplastica ha frequentemente un carattere monomorfo e maligno, tale problematica può essere considerata meno influente, tuttavia in letteratura vi è carenza di studi scientifici che valutano la sensibilità e la specificità diagnostica nella citologia mammaria felina.^{5,13} L'esame citologico viene inoltre utilizzato per la ricerca di cellule neoplastiche su agoaspirati di linfonodi regionali, su reazioni prossime o sulla cicatrice chirurgica per differenziare una recidiva locale del tumore da un processo infiammatorio.⁷ Da quanto detto sull'esame citologico, e poiché esso non permette di definire l'istotipo e di eseguire il grading della neoplasia, si sottolinea che l'esame istologico continua ad essere imperativo, in quanto è rilevante nello stabilire la prognosi e consente la valutazione dei margini di escissione chirurgica della neoplasia, soprattutto se si tratta di un'entità maligna.⁹ Se i margini appaiono liberi dall'infiltrazione neoplastica è raccomandato riferire la distanza in millimetri del tumore dal margine minore; se invece vi è compromissione dei margini di escis-

sione andrebbe specificato, nel referto istologico, se si tratta di presenza di cellule isolate oppure continuità della lesione col margine di escissione.⁹

CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA MORFOLOGICA

In oncologia umana si ricorre frequentemente all'ausilio di tecniche diagnostiche innovative che, ad oggi, non sostituiscono ma affiancano l'esame istopatologico, rimanendo quest'ultimo indispensabile per la diagnosi della maggior parte dei tumori.¹⁴ La finalità della classificazione istologica non è solo quella di inquadrare le neoplasie in una delle tipologie note, ma anche di fornire al clinico informazioni utili sulla prognosi; infatti il sistema di classificazione istopatologica attribuisce alle diverse forme neoplastiche un comportamento biologico specifico.^{11,15}

Nel presentare la classificazione istologica delle neoplasie mammarie va premesso che nella mammella normale, a livello alveolare, si hanno 2 strati di cellule: l'epitelio secernente o luminale e quello basale o mioepitelio. Queste componenti possono proliferare congiuntamente caratterizzando i c.d. tumori complessi della cagna, oppure singolarmente, come avviene nei c.d. tumori semplici, frequenti nella gatta. Nella cagna le proliferazioni sono contraddistinte dall'elevata eterogeneità morfologica e il tumore maligno più comunemente riscontrato è il carcinoma complesso; infatti in questa specie si assiste frequentemente alla proliferazione della componente mioepiteliale accanto a quella epiteliale luminale.^{1,2,4,16} Si è a questo proposito ipotizzato che la proliferazione mioepiteliale influenzi il comportamento biologico del tumore, inibendo la replicazione, l'invasione e l'angiogenesi delle cellule epiteliali luminali tumorali.¹⁶ Pertanto tali neoplasie avrebbero un comportamento biologico meno aggressivo rispetto alle altre forme tumorali c.d. semplici, in cui la proliferazione della componente mioepiteliale manca.^{4,17,18} Nella gatta invece l'entità maligna più rappresentata è il carcinoma tubulo-papillare semplice;⁵ infatti, similmente alla donna, l'eterogeneità morfologica delle proliferazioni è decisamente inferiore, con predominanza di forme semplici costituite cioè generalmente da elementi epiteliali luminali.¹⁴

Tra i primi sistemi classificativi dei tumori mammariali della cagna e della gatta si ricorda la "Classificazione Istologica Internazionale dei Tumori degli Animali Domestici" di Hampe e Misdorp pubblicata nel 1974.¹¹ Questa classificazione venne modificata nel 1999 da Misdorp e coll., approvata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità e pubblicata dall'*Armed Force Institute of Pathology*.¹⁷

Ad oggi il più recente sistema classificativo riguardante i tumori mammariali della cagna è quello pubblicato da

Goldschmidt e coll. nel 2011 (Tabella 1).¹¹ L'innovazione di tale sistema è riassumibile nei seguenti punti:

1) Viene sottolineata l'importanza di porre su livelli diversi neoplasie adenomatose complesse con microfolcoli carcinomatosi (designati carcinoma in adenoma complesso o in tumore misto benigno) e quelli in cui

la componente epiteliale luminale è tutta carcinomatosa (designati carcinomi complessi), rappresentando il primo una forma iniziale rispetto al secondo.¹¹

2) Vengono introdotte nuove entità istologiche e di alcune viene sottolineata l'elevata malignità come ad esempio il carcinoma micropapillare.¹¹

Tabella 1 - Classificazione istologica delle displasie e neoplasie mammarie della cagna secondo Goldschmidt et al. 2011.

Neoplasie epiteliali maligne - Carcinomi	Carcinoma non infiltrante (<i>in situ</i>) Carcinoma semplice a. Tubulare b. Tubulo-papillare c. Cistico-papillare d. Cribriforme Carcinoma micropapillare invasivo Carcinoma solido Carcinoma comedonico Carcinoma anaplastico Carcinoma in adenoma complesso/ in tumore misto benigno Carcinoma complesso Carcinoma e mioepitelioma maligno Carcinoma misto Carcinoma duttale Carcinoma papillare intraduttale
Neoplasie epiteliali maligne - Tipi speciali	Carcinoma a cellule squamose Carcinoma adenosquamoso Carcinoma mucinoso Carcinoma con cellule ricche in lipidi Carcinomi a cellule fusate Mioepitelioma maligno Carcinoma squamoso variante a cellule fusate Carcinoma variante a cellule fusate Carcinoma infiammatorio
Neoplasie mesenchimali maligne - Sarcomi	Osteosarcoma Condrosarcoma Fibrosarcoma Emangiosarcoma Altri sarcomi
Carcinoma o sarcoma in tumore benigno	
Neoplasie benigne	Adenoma semplice Adenoma papillare intraduttale Adenoma duttale (Adenoma basaloide) Con differenziazione squamosa Fibroadenoma Mioepitelioma Adenoma complesso (adenomioepitelioma) Tumore misto benigno
Iperplasie e displasie mammarie	Ectasia duttale Iperplasia lobulare (Adenosi) Classica – con attività secernente – con tessuto connettivo fibroso interlobulare – con atipia Epiteliosi Papillomatosi Cambiamento fibroadenomatoso Ginecomastia

Nella cagna, specie nella quale le neoplasie sono frequentemente proliferazioni complesse, la classificazione morfologica suggerisce, per alcune entità, l'oggettivazione delle componenti mediante immunohistochimica; contrariamente, nella gatta i carcinomi semplici prevalgono.

- 3) Viene evidenziata la possibilità che la componente mioepiteliale neoplastica sia maligna e, di conseguenza, vengono riconosciute come nuove entità istologiche il mioepitelioma maligno e il carcinoma associato a mioepitelioma maligno.¹¹
- 4) Per la prima volta nel sistema classificativo delle neoplasie mammarie in ambito veterinario, viene indicato di oggettivare il riconoscimento della componente epiteliale luminale e mioepiteliale mediante esame immunohistochimico, esistendo infatti casi in cui le due componenti con l'ematossilina-eosina non sono facilmente differenziabili.¹¹ Con l'indagine immunohistochimica, la proliferazione epiteliale luminale è oggettivata mediante l'espressione dei seguenti marcatori: citocheratina (K)8, K18, K19 e K7, mentre quella mioepiteliale mediante K5/6, K14, K17, α -actina del muscolo liscio, calponina,

vimentina, p63. L'applicazione di questo sistema classificativo, potrebbe quindi richiedere per una diagnosi definitiva di istotipo, in aggiunta all'esame istologico di routine con colorazione ematossilina-eosina, anche l'indagine immunohistochimica per identificare ottimamente le due componenti.³

Per la gatta, specie in cui all'opposto prevalgono tumori mammary monomorfi biologicamente aggressivi, la classificazione che viene utilizzata è tuttora la *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat* formulata nel 1999 dalla World Health Organization (Tabella 2).¹⁷ La maggior parte delle neoplasie mammarie della gatta derivano dall'epitelio luminale e si definiscono quindi adenomi e carcinomi, con la seconda categoria che rappresenta il 90% dei casi; il tipo istologico più frequente nella gatta è infatti rappresentato dal carcinoma tubulo-papillare.^{5,6} Sono stati descritti anche carcinomi a morfologia cribriforme e con differenziazione squamosa e mucosa, come per la cagna.¹³ Un'innovazione riguardante gli istotipi del tumore mammary felino è stata recentemente proposta con lo studio di Zappulli e coll. (2013),¹³ nel quale vengono descritti due nuovi sottogruppi di tumori mammary morfologicamente a sé stanti: l'adenoma/carcinoma duttale e l'adenoma/carcinoma papillare intraduttale. In tali tumori

Tabella 2 - Classificazione istologica delle displasie e neoplasie mammarie della gatta secondo Misdorp et al. 1999.

Neoplasie epiteliali maligne - Carcinomi	Carcinoma non infiltrante (in situ) Carcinoma tubulo-papillare Carcinoma solido Carcinoma cribriforme Carcinoma squamoso Carcinoma mucoso
Neoplasie mesenchimali maligne - Sarcomi	Carcinosarcoma
Carcinoma o sarcoma in tumore benigno	
Neoplasie benigne	Adenoma Adenoma Semplice Adenoma complesso Fibroadenoma Fibroadenoma a bassa cellularità Fibroadenoma ad alta cellularità Tumore misto benigno Papilloma duttale
Tumori non classificati	
Iperplasie e displasie mammarie	Iperplasia duttale Iperplasia lobulare Iperplasia epiteliale Adenosi Fibroadenomatosi Cisti Ectasia duttale Fibrosi focale (fibrosclerosi)

viene evidenziata la proliferazione mioepiteliale, la quale mostra tuttavia un pattern di crescita differente rispetto alla tipica proliferazione complessa della cagna. Per tale ragione viene sconsigliato l'utilizzo del termine "complesso" nella gatta. Tali sottotipi sembrano avere un comportamento biologico meno aggressivo rispetto agli altri tipi di carcinoma mammario felino.¹³

VALUTAZIONE DEL GRADO ISTOLOGICO

L'informazione più importante che si può ottenere dall'esame istopatologico di un tessuto asportato chirurgicamente è quella relativa alla prognosi.^{10,13,19} Il grado istologico rappresenta il sistema più utilizzato per quantificare la malignità istologica dei carcinomi mammari, essendo significativamente associato all'intervallo esente da malattia e alla sopravvivenza e, almeno nel cancro al seno, viene ormai considerato un dato fondamentale da inserire nel referto istologico.¹⁴ Esso potenzia le informazioni già fornite dal patologo al clinico tramite la classificazione istologica morfologica, non la sostituisce ma la complementa.^{20,21}

La maggior parte dei sistemi di grading del tumore mammario proposti per gli animali domestici proviene dalla medicina umana e si basa sull'applicazione del metodo di Elston ed Ellis (EE).^{11,20,21,22} L'importanza di un adattamento del grading istologico umano agli animali da compagnia sta nel fatto che devono essere adeguatamente considerate le già sottolineate differenze di specie riguardo all'istotipo delle neoplasie mammarie, con la netta prevalenza di proliferazioni di cellule sia epiteliali luminali sia mioepiteliali nella cagna

Il grading nella cagna discrimina la componente carcinomatosa lumenale valutando formazione di tubuli, pleomorfismo nucleare e conta mitotica; nella gatta viene suggerito un sistema basato sull'invasione linfovaskolare, forma del nucleo e conta mitotica.

(complesso), mentre solamente di quelle epiteliali luminali nella gatta e nella donna (semplice).^{20,22}

Il più recente sistema di graduazione per la cagna è quello proposto da Peña e coll. del 2011 (Tabella 3),²⁰ che secondo una recente indagine si è dimostrato avere il migliore valore predittivo.²⁰

Come per sistemi più datati, ad esempio quello di Misdorp del 1999,¹⁷ del quale il sistema di Peña oggi si propone come alternativa, il grading istologico delle neoplasie mammarie nella cagna si basa sulla stima di 3 caratteri: 1) differenziazione tubulo ghiandolare; 2) anaplasia nucleare; 3) indice mitotico da valutare in 10 campi a forte ingrandimento (400x).²⁰ Quest'ultimo parametro va stimato in aree neoplastiche nelle quali le cellule esprimano la più elevata attività mitotica disponibile nella sezione.²⁰

Ogni parametro fornisce un punteggio che, sommato con quello degli altri, conferisce alla neoplasia un totale che ne definisce il grado di crescente malignità: da ben differenziato o grado I, moderatamente differenziato o grado II, a scarsamente differenziato o grado III.²⁰ Nello studio di Karayannopoulou del 2005,²¹ che valuta l'applicazione del sistema di grading di Elston and Ellis,²² è stata rilevata una sopravvivenza netta-

Tabella 3 - Criteri per il grado istologico di malignità nel carcinoma mammario della cagna secondo Peña et al. 2011.

Formazione di tubuli	Pleomorfismo nucleare	Mitosi in 10 campi a forte ingrandimento	
Abbondante > 75% nel campione	Nuclei piccoli regolari e uniformi e occasionali nucleoli	< 9 mitosi	→ score 1
Moderata 10-75% nel campione	Moderata variazione in dimensione e forma del nucleo, nucleo ipercromatico e presenza di nucleoli alcuni dei quali prominenti	10 - 19 mitosi	→ score 2
Minima o assente < 10% nel campione	Marcata variazione in dimensione del nucleo, nucleo ipercromatico e frequente presenza di uno o più nucleoli prominenti	> 20 mitosi	→ score 3
Score totale	Grado	Decessi in un periodo di follow-up di minimo 28 mesi	
3-5	I (Carcinoma di basso grado)	0%	
6-7	II (Carcinoma di grado intermedio)	15,8%	
8-9	III (Carcinoma di alto grado)	58,8%	

mente inferiore nei carcinomi di grado III rispetto al grado II e I, a due anni dopo la chirurgia.²¹

Il sistema più recente, proposto da Peña e coll. (2011)²⁰, considera l'eterogeneità dei carcinomi mammari della cagna, aggiornando alcuni aspetti, di seguito elencati, rispetto al sistema precedente. Nelle neoplasie complesse e miste la "formazione di tubuli" va valutata solo nelle aree epiteliali e, in caso di tumore caratterizzato da aspetti eterogenei, nelle aree a più elevata malignità. L'esclusione del mioepitelio è in questo caso necessaria poiché la componente mioepiteliale neoplastica, quando presente, difficilmente assume una configurazione tubulare, aspetto che se considerato nel punteggio finale, farebbe erroneamente assumere l'indicazione di neoplasia scarsamente differenziata. In caso di mioepitelioma maligno viene invece assegnato per convenzione un valore intermedio pari a 2. Infine, la valutazione del pleomorfismo nucleare nelle neoplasie complesse e miste va effettuato su tutte le componenti maligne. In base a tali considerazioni si deduce perché sia ribadita l'importanza di identificare la componente mioepiteliale.^{3,20}

Per la gatta sono stati ugualmente proposti sistemi di grading istologico tratti dalla modificazione del sistema di EE.^{2,19,24} Tuttavia i carcinomi mammari della gatta, come già esposto, sono comunemente ritenuti aggressivi sul piano biologico e aventi prognosi generalmente infausta, con un'elevata tendenza all'infiltrazione, alla recidiva locale e alla metastatizzazione.⁵ L'intervallo di sopravvivenza, d'altronde, può variare significativamente, arrivando ad anni in molti casi e stabilire quindi solamente il tipo istologico del carcinoma risulta essere un'informazione insufficientemente discriminativa per predire la prognosi.^{19,24} Recentemente Matos e coll. (2012)¹⁹ hanno richiamato l'attenzione sulla necessità di un sistema di grading formulato specificatamente sul carcinoma mammario della gatta, nella quale diagnosi precoce, caratterizzazione istologica affidabile e un trattamento aggressivo potrebbero avere un'influenza significativa sui tempi di

sopravvivenza.¹⁹ Diversi studi^{2,24,25} hanno applicato il sistema di EE, utilizzato nella donna, alla gatta basandosi primariamente sull'evidenza che il carcinoma mammario della gatta rappresenti un valido modello per il cancro al seno.^{2,24,25} Tuttavia i risultati dell'utilizzo di questo sistema mostrano come le neoplasie feline risultino fortemente concentrate tra il grado II (mediamente differenziato) e III (scarsamente differenziato), avendo perciò scarso potere discriminante per inquadrare i carcinomi di grado I (ben differenziati) e meno aggressivi.² È stato inoltre sottolineato come i tumori della gatta di grado II manchino fortemente di valore prognostico, ed è in questa categoria che ricade la maggior parte dei tumori.²³ Il sistema di EE non è stato quindi adottato su ampia scala dai patologi diagnostici perché non è percepito come un sistema in grado di migliorare la precisione della prognosi. Nell'asimmetria di questa classificazione gioca un ruolo chiave la valutazione del pleomorfismo nucleare e della conta mitotica, indici ai quali, per le caratteristiche morfologiche proprie dei carcinomi della gatta, viene attribuito un punteggio elevato che sbilancia lo score totale sui gradi superiori (II e III).² È necessario d'altronde precisare che sono presenti diversi studi che hanno messo in evidenza l'utilità dell'applicazione dell'EE alla gatta con un buon valore predittivo per il grado I e III in gatte non sterilizzate.^{24,25,26}

Nello studio di Mills e coll. (2015)² sono stati ultimamente valutati tre sistemi di grading.² Come per la cagna in due sistemi i parametri considerati sono la formazione di tubuli, il pleomorfismo nucleare e la conta mitotica; nel terzo vengono inclusi nella valutazione anche l'invasione linfovaskolare e la forma del nucleo.² Viene poi proposto dagli autori stessi un nuovo metodo, illustrato in Tabella 4, basato esclusivamente su quei criteri risultati fattori prognostici indipendenti: invasione linfovaskolare, forma del nucleo e conta mitotica (Figura 1).² È emerso che, utilizzando quest'ultimo sistema, i carcinomi di basso grado sono più adeguatamente rappresentati, quindi identificati, rispetto

Tabella 4 - Criteri per il grado istologico di malignità per il carcinoma mammario invasivo della gatta secondo Mills et al. 2015.

Invasione linfovaskolare	Forma del nucleo	Conteggio delle mitosi in 10 campi con elevata attività mitotica a forte ingrandimento (400x)	
Presenza	≤ 5% anormale	≤ 62 mitosi	→ score 0
Assenza	> 5% anormale	> 62 mitosi	→ score 1
Score totale	Grado	Sopravvivenza mediana	
0	I (carcinoma di basso grado)	31 mesi	
1	II (carcinoma di grado intermedio)	14 mesi	
2-3	III (carcinoma di alto grado)	8 mesi	

Per stadiare con precisione una neoplasia si suggerisce di effettuare una colorazione immunohistochimica antipancitocheratine sul linfonodo regionale per rivelare la presenza di cellule singole o microfocolai di cellule epiteliali metastatiche.

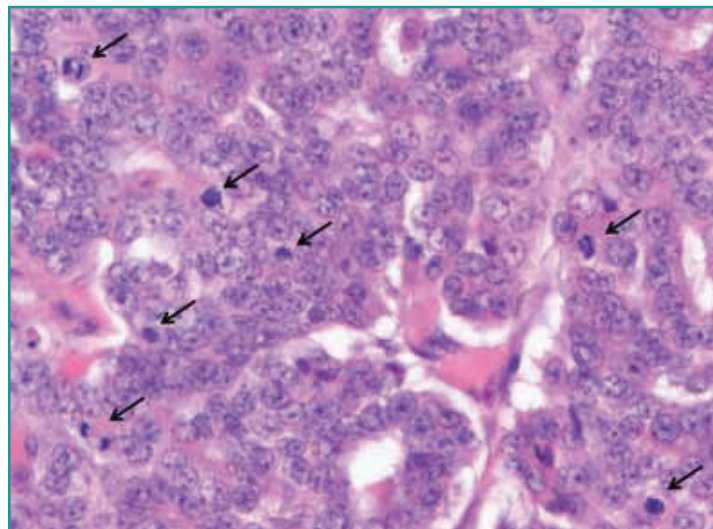


Figura 1 - Gatta, carcinoma tubulo-papillare. La conta mitotica è uno dei parametri valutati per stabilire il grading di un carcinoma mammario; nella gatta, specie in cui predominano tumori biologicamente aggressivi, è frequente osservare numerose mitosi: nel campo vengono indicate dalle frecce 7 mitosi. (Ematossilina-Eosina, 40X).

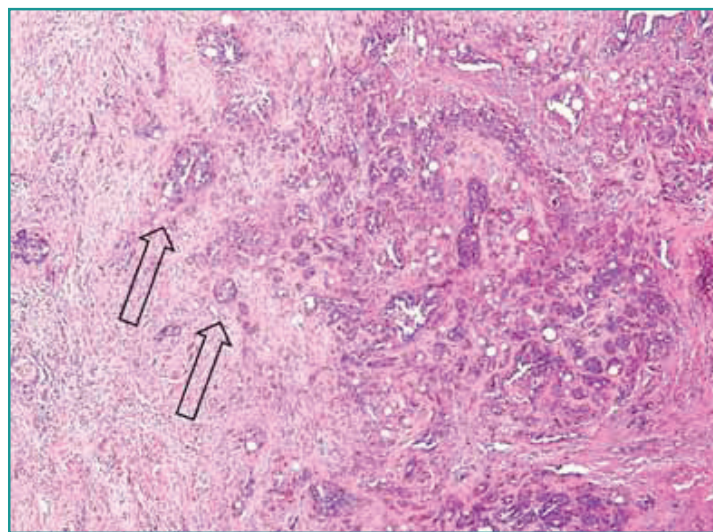


Figura 2 - Cagna, carcinoma mammario semplice tubulo-papillare. Lo stadio istologico 1 caratterizza quei tumori che presentano invasività locale; nel campo è evidente come prolungamenti di cellule neoplastiche (indicate dalla freccia) invadono lo stroma circostante. (Ematossilina-Eosina, 4X).

al sistema di classificazione di EE.² È quindi auspicabile l'utilizzo di un sistema di grading specie-specifico per il carcinoma mammario della gatta, avendo questi

maggiori possibilità di integrare la diagnosi istologica per finalità prognostica. Futuri studi sono necessari per confermare questi risultati, chiarire il ruolo della sterilizzazione, e fornire il definitivo orientamento per il sistema di grading più appropriato da utilizzare in gatte affette da carcinoma mammario.²

STADIO ISTOLOGICO

Lo stadio istologico, termine introdotto da Gilbertson nel 1983,²⁷ è il parametro con cui si valuta l'invasività della neoplasia, considerando di stadio istologico 0 le neoplasie maligne non infiltranti, che cioè non superano la membrana basale su cui poggia l'epitelio della ghiandola, definite anche carcinoma *in situ*, mentre gli stadi istologici I, II e III rappresentano neoplasie maligne ed infiltranti con invasione rispettivamente stromale locale (I) (Figura 2), del linfonodo regionale (Figura 3) e/o presenza di emboli neoplastici (II) (Figura 4), o metastasi sistemiche (III).²⁷ Logicamente l'esame istologico, che di norma si basa su campioni della neoplasia primaria e del linfonodo regionale, non può andare oltre la stima dello stadio istologico II.²⁸ È poi demandato al clinico escludere la presenza di metastasi sistemiche con indagini diagnostiche ulteriori per inquadrare più correttamente il soggetto nello stadio II (assenza di metastasi sistemiche) o in quello III (presenza di metastasi sistemiche).^{27,28}

Si sottolinea inoltre, affinché il patologo possa effettuare la stima dello stadio istologico II, la necessità di un attento esame dei linfonodi tributari mediante esame citologico, prima della chirurgia, e/o esame istologico, dopo l'escissione chirurgica, indispensabili per determinare la diffusione della patologia neoplastica mammaria.^{1,9} Nonostante la colorazione standard con ematossilina e eosina del linfonodo permetta l'identificazione della maggior parte delle micro-metastasi, uno studio di Matos e coll. (2006)²⁹ ha rilevato come la colorazione dei linfonodi con un anticorpo antipancitocheratine, specifico per identificare le cellule epiteliali, abbia svelato sul totale dei linfonodi esaminati, considerati esenti da metastasi, la presenza di cellule

citocheratine, specifico per identificare le cellule epiteliali, abbia svelato sul totale dei linfonodi esaminati, considerati esenti da metastasi, la presenza di cellule

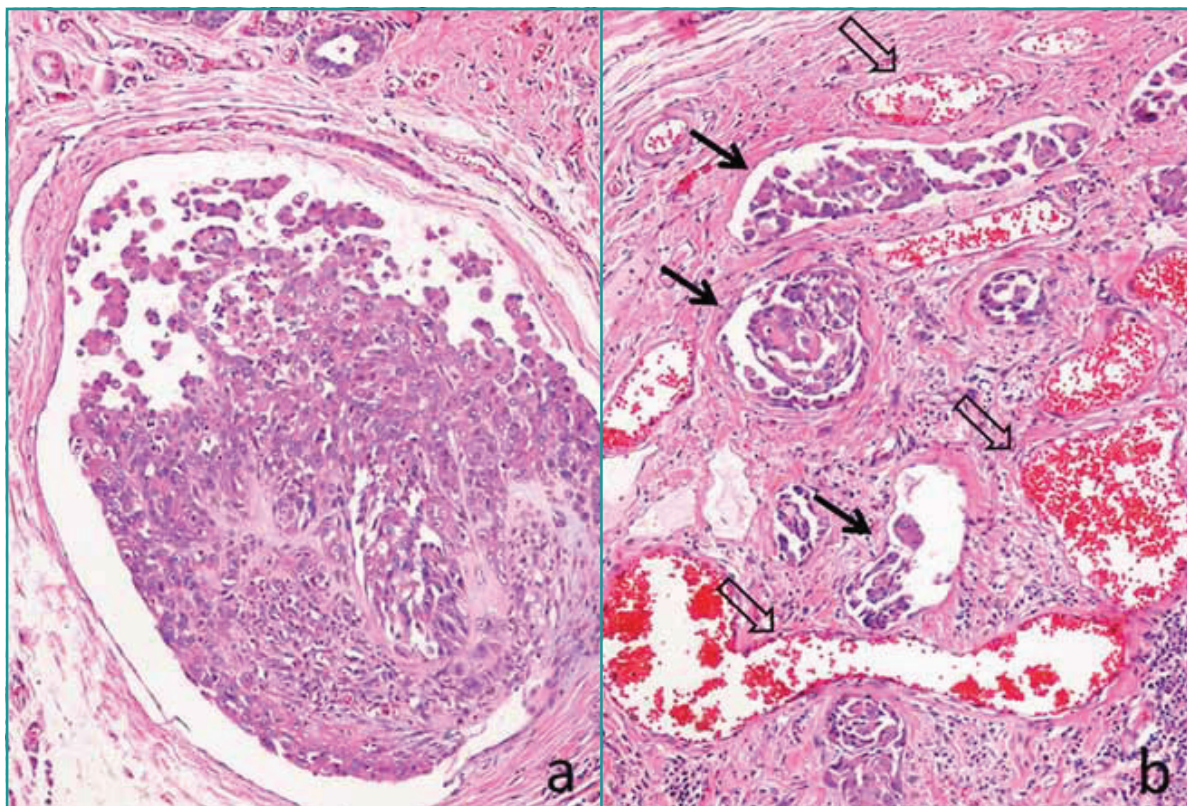


Figura 3 - Cagna, carcinoma mammario semplice tubulo-papillare. Lo stadio istologico 2 caratterizza quei tumori che presentano emboli neoplastici e/o metastasi al linfonodo regionale. La via di metastatizzazione dei carcinomi è preferenzialmente quella linfatica: nel riquadro "a" è presente un embolo di notevoli dimensioni all'interno di un vaso; nella figura "b" si evidenziano numerosi emboli nel settore linfatico (freccie piene), mentre risultano esenti dall'embolizzazione i vasi ematici (freccie vuote). (Ematossilina-Eosina, 10X).

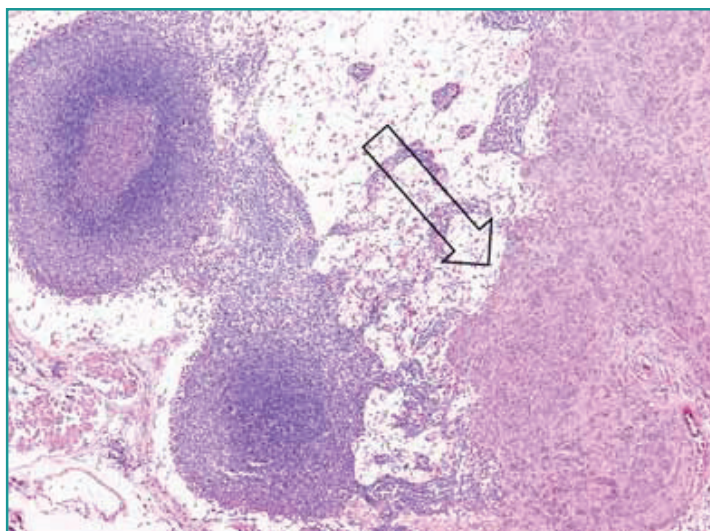


Figura 4 - Cagna, linfonodo inguinale. Lo stadio istologico 2 inquadra quei tumori che presentano emboli neoplastici e/o metastasi al linfonodo regionale. Nella figura, sulla destra (indicata dalla freccia), è evidente una metastasi di un carcinoma mammario che si accresce a livello del linfonodo tributario del quale, sulla sinistra dell'immagine, si osservano due follicoli iperplastici. (Ematossilina-Eosina, 4X).

Studi recenti hanno confermato l'esistenza nella cagna e nella gatta dei fenotipi molecolari già noti per il carcinoma al seno, che potrebbero fornire informazioni specifiche per la prognosi e la terapia.

single o microfocolai di cellule metastatiche al linfonodo quasi nel 10% dei casi.²⁹ Di fronte a una diagnosi di neoplasia epiteliale maligna ed infiltrante, è quindi auspicabile eseguire sul linfonodo un'indagine immunoistochimica per la ricerca di cellule epiteliali metastatiche nei campioni negativi ad un primo scree-

ning con ematossilina eosina (Figura 5).^{1,9,29} Va specificato che, sebbene da più studi^{30,31} sia emerso che la presenza di macrometastasi (> 2 mm) ai linfonodi tributari sia un parametro prognostico negativo, esistono dati contrastanti riguardanti la presenza di micro-metastasi (foci metastatici di diametro compreso tra

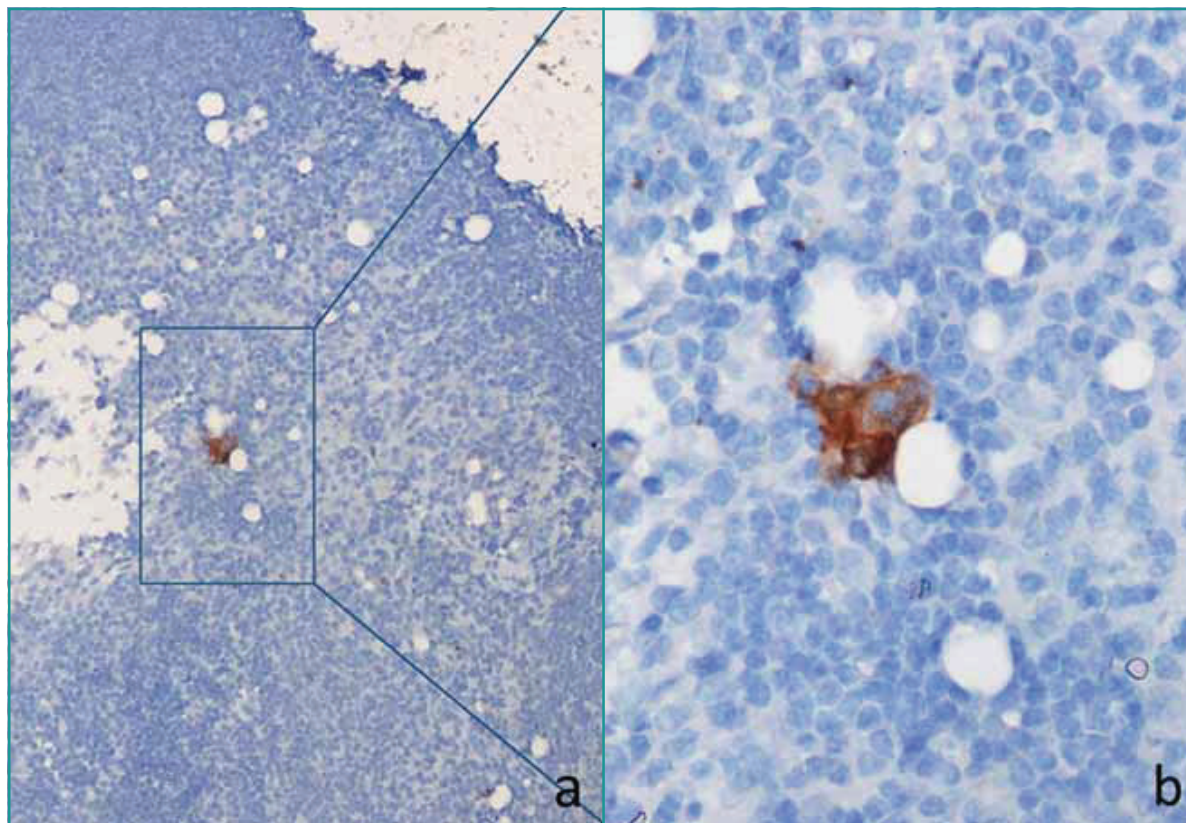


Figura 5 - Cagna, linfonodo inguinale asportato in corso di mastectomia. È stata eseguita una colorazione immunoistochimica con anticorpo anti-pancitocheratine che evidenzia un microfocolaio di cellule epiteliali neoplastiche metastatiche a piccolo (a) e forte ingrandimento (b). (Colorante DAB, colorazione di contrasto Ematossilina di Papanicolau a:10X, b:40X).

0,2 e 2 mm) e di cellule tumorali isolate (gruppi di cellule di diametro < 0,2 mm). Nello studio di Szczubiat e colleghi,³⁰ viene sottolineato che nella cagna la sopravvivenza post-chirurgica è significativamente diversa solo tra gruppi caratterizzati da assenza di metastasi rispetto a quelli nei quali sono evidenti macro-metastasi linfonodali.³⁰ Nel recente studio di Araújo e colleghi (2015)³¹, invece, viene confermata l'importanza ai fini prognostici del riscontro di macrometastasi, in particolare se di diametro maggiore di 7,32 mm e se presenti in più stazioni linfonodali, ma viene significativamente rilevato che anche la presenza di singole cellule tumorali, identificabili con certezza mediante l'esame immunoistochimico, sia associata ad una minore sopravvivenza rispetto ai soggetti che non presentano metastasi, e probabilmente a un istotipo più aggressivo.³¹ Allo stato attuale, quindi, non è univoco il significato da attribuire alle micrometastasi linfonodali.^{30,31}

CLASSIFICAZIONE FENOTIPICA DEI CARCINOMI MAMMARI

Come il cancro al seno della donna, il carcinoma mammario della cagna e della gatta rappresenta un

L'indagine dell'espressione fenotipica dei recettori per gli ormoni steroidei e dell'ERB2 nei carcinomi permetterebbe di selezionare quali soggetti trarrebbero beneficio da una terapia mirata, come praticato in medicina umana.

gruppo di neoplasie eterogeneo in termini di morfologia e comportamento biologico indipendentemente dal tipo istologico.^{32,33,34} Gli studi sul profilo di espressione genica del cancro al seno hanno definito dei sottotipi molecolari che differiscono nella loro patobiologia e nella prognosi.^{14,34,35,36} Il profilo di espressione genica è considerato il *gold standard* per l'identificazione dei sottotipi di cancro al seno, ma è poco pratico per l'applicazione nella routine clinica e per l'utilizzo su campioni di tessuto inclusi in paraffina.¹⁴ Per questo è stato fruttuosamente proposto l'uso di un pannello di marcatori immunoistochimici che permettano una suddivisione in sottogruppi sovrapponibili a quelli dell'indagine di espressione genica.¹⁴ Il pannello anticorpale indicato è costituito dagli anticorpi anti-recettore per gli estrogeni, - recettore del progesterone, - recet-

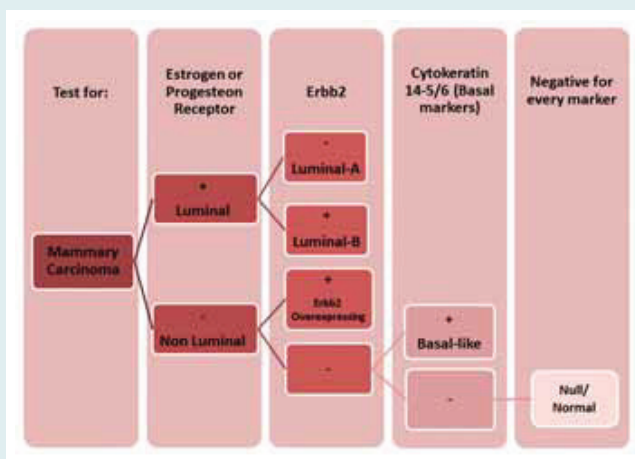
tore 2 per il fattore di crescita epidermico (ERB-B2) - K5/6 e -K14; definendo i sottotipi tumorali in **luminal-like** per quelle neoplasie che esprimono i recettori per estrogeno o progesterone, e **non luminal-like** per quelle che non esprimono i recettori per gli ormoni.¹⁴ Questa seconda categoria viene ulteriormente suddivisa in **ERB-B2-overexpressing** per quei tumori che sovraesprimono il recettore ERB-B2 (importante recettore per il corrispondente fattore di crescita spesso mutato nelle neoplasie maligne), e in **basal-like** per quelli che possiedono un fenotipo simile alle cellule basali; infine il sottotipo **normal-like** comprende le neoplasie risultate negative a tutti i marcatori (Tabella 5).^{34,35} Da allora questa classificazione è costantemente utilizzata in medicina umana: ad ogni sottotipo è associata una diversa prognosi, trattamento, e pattern metastatico. I sottotipi non luminal-like sono quelli dal comportamento clinico più aggressivo.^{14,34,35} L'importanza di poter applicare tale nuovo sistema classificativo su base molecolare nelle neoplasie mammarie in medicina veterinaria trova un duplice riscontro: primo, il possibile ruolo che ogni sottotipo assumerebbe come indicatore prognostico svincolato dal tipo istologico, maggiormente affidabile stante i limiti già delineati dell'istotipo per finalità prognostiche; secondo, aprirebbe la strada ad un trattamento terapeutico mirato.^{3,37} Infatti in medicina umana il cardine della terapia del cancro al seno appartenente al fenotipo luminal (esprime i recettori ormonali) sta nell'inibizione del recettore estrogenico mediante una terapia mirata (modulatori degli estrogeni, inibitori dell'aromatasi).³⁸ Per quei tumori che mostrano, invece, l'amplificazione del gene ERB-B2 e/o la sovraespressione

della corrispettiva proteina, sono state sviluppate molecole ad attività farmacologica (per esempio Trastuzumab-HerceptinTM) indirizzate selettivamente contro questa glicoproteina.^{39,40}

In medicina veterinaria è stato proposto un pannello immunoistochimico per la cagna e per la gatta sovrapponibile a quello usato per il carcinoma mammario della donna.^{18,32,33} I risultati ottenuti hanno complessivamente confermato l'esistenza anche in queste specie dei fenotipi molecolari noti per il carcinoma al seno.^{18,32,33,34,36} Inoltre sono stati estrapolati dati di interesse clinico che contraddistinguono i diversi fenotipi: Sartin e coll. (1992)⁴¹ hanno correlato l'assenza di recettori per estrogeno e progesterone nel carcinoma mammario della cagna con un tempo di sopravvivenza più corto.⁴¹ Sia nella cagna che nella gatta è presente una diminuzione dell'espressione dell'ER tra la mammella normale e quella neoplastica, ed un grado di perdita ulteriormente maggiore nei carcinomi invasivi della gatta.^{6,18} L'alta percentuale di tumori negativi per l'ER sembra essere una prerogativa dei carcinomi della gatta e suggerisce l'assenza di ormono-dipendenza.⁶ Si può così affermare che la cagna possa essere un buon modello animale ed abbia caratteristiche comuni alle neoplasie ormono-dipendenti del cancro al seno della donna, mentre la gatta lo possa essere per le neoplasie mammarie ormono-indipendenti.⁶ La notevole diminuzione dell'espressione del ER nei carcinomi della gatta può dare una spiegazione della loro aggressività.²³ Va precisato che sono ancora scarsi gli studi che forniscono informazioni dettagliate sul significato prognostico dei differenti fenotipi di carcinoma mammario della cagna e della gatta.

Effettuare l'indagine del pattern di espressione fenotipica dei recettori per gli ormoni steroidei e dell'ERB-B2 nei carcinomi sarebbe quindi rilevante per selezionare quali soggetti potrebbero trarre beneficio dalla terapia mirata con modulatori degli estrogeni e/o inibitori dell'aromatasi, nei soggetti con carcinoma appartenente al sottotipo luminal, oppure mediante terapia anticorpale per il sottotipo ERB-B2-overexpressing (es. Trastuzumab), come praticato in medicina umana.^{1,3,6,40,42} Nella donna infatti questo protocollo è ampiamente utilizzato, in medicina veterinaria invece, anche a causa della relativa difficoltà e costi nell'eseguire gli esami necessari ad accertare l'espressione dei recettori, è ancora sottoimpiegato¹. Il farmaco maggiormente conosciuto è il Tamoxifene che possiede sia effetti estrogenici sia

Tabella 5 - Algoritmo utilizzato per la fenotipizzazione dei carcinomi mammary della cagna e della gatta.
ErbB2=human epidermal growth factor receptor 2.



antiestrogenici, ed è stato per molti anni il farmaco più utilizzato nelle donne con tumore al seno ER+. Gli effetti della terapia ormonale sul tumore mammario della cagna sono ancora non univoci: uno studio pilota ha mostrato come in 5 su 7 animali che presentavano metastasi o tumore inoperabile chirurgicamente si sia assistito ad una diminuzione dell'estensione del tumore dopo la terapia.⁴³ Il medesimo studio ha messo anche in evidenza come nell'utilizzo di questo farmaco è sempre necessario considerarne gli effetti collaterali: in primis la possibilità, intorno al 20%, che la cagna, se intera, sviluppi una piometra.^{1,43} Nella gatta non esistono studi sull'uso di farmaci antiestrogenici perché, come già evidenziato, in questa specie la maggior parte dei carcinomi perdono diffusamente l'ER e quindi non ne trarrebbero beneficio.⁵

Per quanto concerne la terapia anticorpale, anch'essa nella cura del cancro al seno ER-B2-overexpressing, i limiti che si impongono per la cagna sono i costi e le informazioni ancora relativamente scarse sull'omologia di espressione antigenica tra donna e cagna; sono quindi necessari ulteriori studi che pongano maggior chiarezza su questa via.¹ Nello studio di Singer e coll. (2012) viene messo in evidenza l'alto grado di omolo-

gia tra gli antigeni tumore associati ER-B1 e 2 dell'uomo e del cane e viene dimostrato in vitro come gli anticorpi inibiscano sensibilmente la proliferazione di linee cellulari di tumore mammario canino, aprendo la strada ad una fruttuosa applicazione in vivo.⁴⁴

Nei recenti studi sul cane e sul gatto di Brunetti (2013)³³ e Beha e coll. (2012 e 2014)^{18,45} l'analisi del fenotipo molecolare del carcinoma mammario non si è limitata solo al tumore primario, ma ha preso in considerazione l'espressione del pannello anticorpale nelle metastasi regionali e sistemiche, col fine di stabilire la presenza di concordanza o meno del fenotipo molecolare nei diversi siti (primario e metastatico).^{18,33,45} Poiché da queste indagini è emersa una percentuale non irrilevante (35% nella cagna e 43% nella gatta) di non concordanza tra fenotipo del tumore primario e la metastasi al linfonodo regionale, ne consegue che la pianificazione della terapia sull'analisi fenotipica del solo tumore primario possa avere probabilità di insuccesso in casi non concordanti.^{18,31,45} Nella cagna il più frequente cambiamento di fenotipo tra tumore primario e metastasi linfonodale è da luminal-like a non luminal-like, mentre nella gatta è da luminal-like a ERB-B2 overexpressing.^{18,33} La valutazione del fe-

PUNTI CHIAVE

- Il trattamento neoplasie mammarie è ancora predominantemente chirurgico: la valutazione dei margini di escissione è un importante parametro prognostico. L'esame citologico viene indicato da alcuni per distinguere, prima della chirurgia, masse benigne da quelle maligne, ma, in particolare nella cagna, presenta notevoli insidie nell'interpretazione.
- La classificazione istologica morfologica non solo inquadra la neoplasia in una delle tipologie note ma fornisce al clinico informazioni utili sulla prognosi. Nella cagna, l'entità maligna più comune è il carcinoma complesso; contrariamente, nella gatta, è quello semplice.
- Il grado istologico rappresenta il sistema più utilizzato per quantificare la malignità dei carcinomi mammari della cagna e della gatta, essendo significativamente associato all'intervallo esente da malattia e alla sopravvivenza.
- Lo stadio istologico è il parametro che valuta l'invasività e la diffusione della neoplasia. Si suggerisce di effettuare sempre una colorazione immunoistochimica antipancitocheratine sul linfonodo tributario per rivelare la presenza di microfocoli o singole cellule epiteliali metastatizzate al linfonodo.
- Recenti studi hanno confermato l'esistenza anche nella cagna e nella gatta dei fenotipi molecolari, già noti per il cancro al seno. La suddivisione dei carcinomi in sottotipi si può effettuare tramite l'applicazione di un pannello anticorpale.
- L'analisi del sottotipo del carcinoma mammario potrebbe fornire indicazioni prognostiche svincolate dal tipo istologico e quindi maggiormente affidabili e aprirebbe la strada ad un trattamento terapeutico mirato.

notipo del tumore primario confrontato con quello delle metastasi sistemiche fa emergere come sia presente un certo livello di discordanza anche in questo confronto, tuttavia il fenotipo che sembra prevalere nei siti metastatici è l'ERB-B2 overexpressing, particolarmente aggressivo, probabilmente per la selezione di cloni di cellule tumorali con maggiori capacità di diffondere metastaticamente.^{45,46}

CONCLUSIONI

Negli anni diversi autori hanno proposto di giudicare le neoplasie mammarie della cagna e della gatta, in modo più pertinente e standardizzato, per ottenere dati omo-

genei, più facilmente confrontabili nella ricerca scientifica e applicabili fruttuosamente alla pratica clinica.^{3,9} Nel complesso universo dei tumori mammarie, neoplasie con aspetti istopatologici simili possono avere un differente comportamento clinico; per questo, alla luce degli ultimi studi, oltre all'ormai assodata utilità della valutazione della triade **tipo, stadio e grado istologico**, sarebbe auspicabile una dettagliata analisi del **fenotipo molecolare** del tumore primario e delle eventuali metastasi regionali e sistemiche, potendo questa fornire informazioni importanti per la prognosi e per indirizzare la terapia della malattia neoplastica, come già dimostrato nella pratica oncologica del cancro al seno.^{38,39,40}

Pathology of mammary tumours of bitches and queens: state of art

Summary

This article presents the latest updates about veterinary mammary histopathological oncology, readily applicable for the diagnosis of mammary tumors in dogs and cats, with a particular focus on those data useful in clinical practice. Innovations regarding the morphological histological classification and new methods recently proposed for the histological grading of canine and feline mammary carcinomas will be described. Finally, the latest acquisitions regarding the application in dogs and cats of the phenotypic molecular classification system, based on breast cancer will be presented.

BIBLIOGRAFIA

1. Carolyn JH. Mammary Cancer. In: Bonagura J, Twedt D. Ed. Kirk's Current Veterinary Therapy XV, St. Louis: Elsevier Saunders, 2014, pp. 375-380.
2. Mills SW, Musil KM, Davies JL *et al.* Prognostic Value of Histologic Grading for Feline Mammary Carcinoma: A Retrospective Survival Analysis. *Veterinary Pathology* 52(2):238-49, 2015.
3. Peña L, Gama A, Goldschmidt MH *et al.* Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 51(1):127-45, 2014.
4. Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V *et al.* Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Veterinary Pathology* 48(1):85-97, 2011.
5. Morris J. Mammary Tumours in cat: size matters so early intervention saves lives. *Journal of feline medicine and surgery* 15(5):391-400, 2013.
6. Millanta F, Calandrella M, Bari G *et al.* Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science* 79(3):225-32, 2005.
7. Marcato PS, Sarli G. Neoplasie mammarie In: Marcato PS. Ed. *Patologia sistematica veterinaria*. Bologna: Edagricole, 2002, pp. 1071-1093.
8. Schneider R, Dorn CR, Taylor DO *et al.* Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute* 43(6):1249-1261, 1969.
9. Cassali GD, Lavalle EG, De Nardi *et al.* Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 4(2):153-180, 2011.
10. Morris J. Improving the Diagnoses and Treatment of Canine Mammary Tumors: Immunohistochemical Markers as Prognostic Tools. *The Veterinary Journal* 184(1):3-4, 2010.
11. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R *et al.* Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* 48(1):117-131, 2011.
12. Cassali GD, Gobbi H, Malm C *et al.* Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumors: comparative features with human tumours. *Cytopathology* 18(3):191-6, 2007.
13. Zappulli V, Caliarì D, Rasotto R, *et al.* Proposed classification of the feline "complex" mammary tumors as ductal and intraductal papillary mammary tumors. *Veterinary Pathology* 50(6):1070-7, 2013.
14. Lester SC. The Breast. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Ed. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease IX*, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015, pp. 1043-1071.
15. Misdorp W. Tumors of the Mammary Gland In: Meuten DJ. Ed. *Tumors in Domestic Animals*, Ames: Iowa State Press, 2002, pp. 575-606.
16. Hellmén E. Complex mammary tumours in the female dog: a review. *Journal of dairy research*, 72:90-7, 2005.
17. Misdorp W, Else RW, Hellmén E *et al.* Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat, 2nd series, vol. 7. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1999.
18. Beha G, Brunetti B, Asproni P *et al.* Molecular portrait-based correlation between primary canine mammary tumor and its lymph node metastasis: possible prognostic-predictive models and/or stronghold for specific treatments? *BMC Veterinary Research* Nov 12:8-219, 2012.
19. Matos AJF, Baptista CS, Gärtner MF *et al.* Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: the need for standardized procedures. *Veterinary Journal* 193(1):24-31, 2012.
20. Peña L, De Andres PJ, Clemente M, *et al.* Prognostic value of histological grading in non-inflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Veterinary Pathology* 50 (1):94-105, 2013.
21. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC *et al.* Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology* 133:246-252, 2005.
22. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer: I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 9:403-410, 1991.
23. Zappulli V, Rasotto R, Caliarì D. Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas: A Review of the Literature. *Veterinary Pathology* 52(1):46-60, 2014.
24. Castagnaro M, Casalone C, Bozzetta E *et al.* Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science* 65:223-226, 1998.
25. Seixas F, Palmeira C, Pires MA, *et al.* Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. *Veterinary Journal* 187(1):65-71, 2011.
26. Tavasoly A, Golshahi H, Rezaie A, *et al.* Classification and grading of canine malignant mammary tumors. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal* 4(1):25-30, 2013.

27. Gilbertson SR, Kurzman D, Zachrau RE *et al.* Canine mammary epithelial neoplasms: biological implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology* 20(2):127-42, 1983.
28. Sarli G, Benazzi C, Galeotti M *et al.* Integrazione di parametri clinici ed istologici nella prognosi dei tumori mammari maligni della cagna e della gatta. *Veterinaria* 14(2):43-59, 2000.
29. Matos AJ, Faustino AM, Lopes C *et al.* Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *The Veterinary Record* 158(18):626-30, 2006.
30. Szczubial M, Łopuszynski W. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Veterinary Comparative Oncology* 9(4):296-303, 2011.
31. Araújo MR, Campos LC, Ferreira E *et al.* Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29(5):1360-7, 2015.
32. Gama A, Alves A, Schmitt F *et al.* Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 453:123-132, 2008.
33. Brunetti B, Asproni P, Beha G *et al.* Molecular phenotype in mammary tumours of queens: correlation between primary tumour and lymph node metastasis. *Journal of Comparative Pathology* 148(2-3):206-13, 2013.
34. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-752, 2000.
35. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumour subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:10869-10874, 2001.
36. Yang XR, Sherman ME, Rimm DL *et al.* Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 16 (3):439-443, 2007.
37. Sassi F, Benazzi C, Castellani G *et al.* Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research* 28:6-5, 2010.
38. Den Hollander P, Savage MI, Brown PH. Targeted Therapy for Breast Cancer Prevention. *Frontiers in Oncology* 23:3-250, 2013.
39. Tebbutt N, Pedersen MW, Johns TG. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. *Nature Reviews. Cancer*. 13:663-673, 2013.
40. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 131:18-43, 2007.
41. Sartin EA, Barnes S, Kwapien RP *et al.* Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 53(11):2196-200, 1992.
42. De Las Mulas JM, Millán Y, Dios R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology* 42(2):200-212, 2005.
43. Novosad C. A Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18(2):107-9, 2003.
44. Singer J, Weichselbaumer M, Stockner T *et al.* Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. *Molecular Immunology* 50(4-3):200-209, 2012.
45. Beha G, Muscatello LV, Brunetti B *et al.* Molecular phenotype of primary mammary tumours and distant metastases in female dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology* 150(2-3):194-7, 2014.
46. Beha G, Muscatello LV, Brunetti B *et al.* Comparison of metastatic phenotypes in mammary tumours of the dog and the cat. *Journal of Comparative Pathology* 152(1):45, 2015.



III° MANAGEMENT FORUM

**La Compliance con il Cliente
per realizzare il nostro Business**

**Palacongressi di Rimini
Sabato 28 Maggio 2016
Sala del Ponte**



In collaborazione con

