

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

**DISCIPLINE ANATOMOISTOPATOLOGICHE
VETERINARIE**

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: VET/ 03

**CLASSIFICAZIONE SU BASE MOLECOLARE DEI
TUMORI MAMMARI DELLA CAGNA MEDIANTE
METODICA IMMUNOISTOCHIMICA**

Presentata da: Dott. Francesco Sassi

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof.

Paolo Stefano Marcato

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa

Cinzia Benazzi

Esame finale anno 2008

Indice

1- Introduzione	2
2- Il tumore al seno	5
2.1- Genetica e sottotipi	6
2.2- Dai geni agli antigeni	13
2.3- La sopravvivenza basata sulla suddivisione in sottotipi	15
2.4- Limiti della classificazione	24
3- Il tumore mammario della cagna	27
3.1- Cenni generali	28
3.2- La classificazione	30
3.3- Problematiche di classificazione	32
3.4- La classificazione umana è la soluzione	36
4- Contributo sperimentale	46
4.1- Materiali e metodi	47
4.1.1- Casi e raccolta dati di follow-up	47
4.1.2- Grado del tumore ed invasività	48
4.1.3- Immunohistochimica	48
4.1.4- Interpretazione della colorazione immunohistochimica	49
4.1.5- Classificazione in sottotipi molecolari	50
4.1.6- Analisi statistica	50
4.2- Risultati	52
5- Discussione	56
6- Conclusione	62
7- Bibliografia	65
8- Iconografia	80

1- INTRODUZIONE

I tumori della ghiandola mammaria sono la più comune neoplasia della cagna e rappresentano un gruppo altamente eterogeneo in termini di morfologia e di comportamento biologico (Nerurkar *et al.*, 1989; Rutteman *et al.*, 2001).

Circa la metà dei tumori mammari del cane sono considerati maligni, pertanto l'identificazione di indicatori prognostici affidabili diventa essenziale al fine della valutazione di rischio soggettivo in seguito ad una indicazione clinica sfavorevole (Misdorp, 2002; Zaidan Dagli, 2008).

Considerata la non omogeneità delle neoplasie mammarie, che risulta dalla classificazione attualmente in uso in medicina veterinaria, e le scarse indicazioni prognostiche di tale sistema classificativo basato unicamente sulle caratteristiche morfologiche dei tumori stessi, si rende indispensabile la ricerca di una nuova metodologia tassonomica, tale da poter offrire al veterinario uno strumento efficace nella valutazione del comportamento biologico di un tumore mammario.

Numerosi studi permettono di considerare la possibile affidabilità di alcuni fattori prognostici, tra questi le dimensioni del tumore, l'istotipo, il grado istologico e il coinvolgimento linfonodale (Karayannopoulou *et al.*, 2005; Misdorp *et al.*, 1999; Misdorp e Hart, 1976). Inoltre, in più recente letteratura, è stato individuato un numero sempre maggiore di ricerche di specifici markers dei tumori mammari del cane (Zaidan Dagli, 2008), come markers di proliferazione (Matos *et al.*, 2006), recettori ormonali (de las Mulas *et al.*, 2005), p53 e human epidermal growth factor receptor (ERB-B2) (Lee *et al.*, 2004; de las Mulas *et al.*, 2003), e molecole di adesione (Gama *et al.*, 2008a; Matos *et al.*, 2007). Tuttavia, l'esperienza clinica è ancora limitata, e non sono sempre disponibili risultati affidabili di studi prospettici (Gama *et al.*, 2008a). Anche la medicina umana si è trovata di fronte a questi tipi di problemi e da qualche anno, stante l'eterogeneità cellulare e molecolare dei tumori al seno, e visto il gran numero di geni potenzialmente coinvolti nel controllo della crescita, nella differenziazione e nella morte cellulare, si è enfatizzata l'importanza degli studi sulle multiple alterazioni genetiche. Sistematiche ricerche sui pattern di espressione di migliaia di geni in corso di tumore, utilizzando cDNA microarray, e la

loro correlazione con specifiche caratteristiche di variazioni fenotipiche, hanno posto le basi per una miglior classificazione della neoplasia (Alizadeh *et al.*, 2000; Perou *et al.*, 2000).

E' stato infatti dimostrato, più recentemente, che analizzando il pattern di espressione genica su sezioni di tumori al seno della donna tramite cDNA microarray e *hierarchical clustering* (o *clustering gerarchico*), si è raggiunto un ben definito "ritratto molecolare" per ogni tumore, e che tali tumori possono essere classificati in sottotipi basandosi esclusivamente sulle differenze in questi patterns (Perou *et al.*, 2000).

Tali indagini sui differenti profili genici hanno rivelato che il tumore al seno può essere considerata un'entità eterogenea (Sotiriou *et al.*, 2003; Perou *et al.*, 2000), e sono stati proposti tre maggiori sottotipi molecolari: 1) tumori ERB-B2-overexpressing, 2) basal-like e 3) luminal-like (Conforti *et al.*, 2007).

Data la difficile applicazione di profili di espressione genica come strumento diagnostico di routine, sono stati proposti pannelli immunoistochimici surrogati, che possono potenzialmente distinguere gli stessi sottotipi di tumori al seno (Matos *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2004).

L'importanza di una nuova classificazione su base molecolare delle neoplasie mammarie troverebbe un duplice riscontro: prima di tutto il possibile ruolo che ogni sottotipo assumerebbe come indicatore prognostico affidabile; secondo, alla luce degli ottimi risultati che la terapia molecolare antitumorale sta riscuotendo negli ultimi anni, renderebbe ancor più efficace un approccio di tipo medico e non chirurgico nei confronti del tumore mammario, oltre ad un più mirato trattamento chemioterapico.

2- IL TUMORE AL SENO

2.1- GENETICA E SOTTOTIPI

Nel 2007, è stato diagnosticato in tutto il mondo un tumore al seno a 1.300.000 donne, e di queste 465.000 sono decedute, rendendo così tale neoplasia la più comune e la principale causa di morte da tumore (American Cancer Society, 2007).

Anche se impressionanti, questi dati considerano il cancro al seno come una entità omogenea, e la maggior parte degli autori ha cominciato a ritenerli imprecisi. Ricerche sull'espressione genica hanno infatti individuato alcuni maggiori sottotipi del tumore al seno (Perou *et al.*, 2000): i sottotipi luminali, che tipicamente esprimono geni legati a recettori ormonali, e due sottotipi negativi per recettori ormonali, cioè quello positivo per il recettore dello human epidermal growth factor-2 (indicato da vari autori con le sigle HER2, ERB-B2, ERBB2)/negativo per il recettore degli estrogeni (ER) e il sottotipo basal-like. Tali sottogruppi differiscono in termini di prognosi, ed in particolare tendenzialmente mostrano peggior evoluzione i due sottotipi ormono-recettori negativi rispetto ai sottotipi luminali (Sorlie *et al.*, 2001; Sotirou *et al.*, 2003). Questa eterogenicità ha posto le basi per una importante sfida per la ricerca di terapie “su misura” verso singoli pazienti, considerando che l'attuale metodo di diagnosi e classificazione pecca nel fornire una distinzione sufficientemente accurata tra i vari tipi di neoplasie (Rakha *et al.*, 2008).

Le ricerche sulle alterazioni genetiche alla base dei tumori mammari cominciano a fiorire alla fine degli anni ottanta, con particolare riguardo nei confronti delle strategie di diagnosi e di prevenzione. Tra queste, gli studi di Callahan e Campbell (1989) suggerirono che alcune mutazioni che frequentemente avvengono durante l'insorgenza di tumori primitivi al seno, coinvolgono l'amplificazione di protooncogeni come il c-myc, il c-erbB-2, e l'int-2, e soprattutto che tali mutazioni contribuiscono ad indurre sperimentalmente tumori mammari in topi usati come modelli per tale patologia.

Alcuni anni dopo, Lizard-Nacol *et al.* (1995) dimostrarono, inoltre, che l'amplificazione di questi tre oncogeni (il c-myc, il c-erbB-2/neu e l'int-2) non era rilevabile in patologie benigne del seno, e tali risultati resero indispensabili ulteriori indagini a livello molecolare delle lesioni pre-tumorali per una miglior conoscenza della patogenesi dei carcinomi mammari, e contribuirono anche alla ricerca del riconoscimento di precoci biomarkers tumorali.

L'attenzione venne quindi rivolta verso l'identificazione dei geni responsabili della maggior parte di questi fenomeni, ed uno screening dei siti cromosomici frequentemente affetti da incrementi o perdite di geni divenne il primo passo verso l'identificazione e la determinazione del loro coinvolgimento nei processi tumorali (Courjal e Theillet, 1997). L'ibridazione genomica comparata si è rivelata un metodo molecolare citogenetico capace di individuare, in un singolo esperimento, sia squilibri genetici in tumori solidi, sia la loro mappatura su normali sviluppi in metafase di riferimento (Courjal e Theillet, 1997). Tale tecnica è stata applicata in numerosi tipi di neoplasie, incluso il tumore al seno, e ha permesso di scoprire amplificazioni e delezioni precedentemente sconosciute (Courjal e Theillet, 1997). Questo studio si basò su precedenti analisi di amplificazione di DNA condotte con Southern blotting, i cui risultati suggerirono che differenti sottotipi di tumore al seno potevano essere definiti, secondo profili derivati proprio da amplificazioni di DNA. Tale tecnica individuò tre sottotipi. Tuttavia, Courjal e Theillet (1997) erano convinti che questi gruppi erano stati definiti entro i limiti inerenti alla tecnica del Southern blotting, che si riteneva in grado di perdere un gran numero di eventi per i quali non era disponibile una sonda. Questo li motivò a completare le loro analisi applicando la metodica di ibridazione genomica comparata su 61 tumori al seno precedentemente tipizzati con il Southern blotting e di inserirli nei 3 sottotipi predefiniti. I risultati ottenuti dimostrarono che vi era una buona concordanza tra le amplificazioni osservate con il Southern blotting e quelle con l'ibridazione genomica comparata e, soprattutto, fornirono una ulteriore prova dell'elevata incidenza di amplificazioni di DNA in corso di tumore al seno (Courjal e Theillet, 1997). Una di esse, riguardava

l'ERB-B2 (da Perou *et al.*, 2000), per il quale fu osservata una stretta associazione con parametri clinico-patologici, suggerendo che i sottotipi tumorali potevano essere caratterizzati secondo i profili di specifiche alterazioni genomiche, ma la complessità dei profili ottenuti con l'ibridazione genomica comparata richiedeva una integrazione di un ancora non determinato numero di eventi genetici che potessero descrivere precisi fenotipi molecolari (Courjal e Theillet, 1997).

A questo punto era chiaro che le patologie neoplastiche, ed in particolare il tumore al seno, erano strettamente collegate ad “anomalie” a livello genetico: amplificazioni, delezioni, mutazioni, alterazioni a livello cromosomico che si erano mostrate in grado di determinare nelle cellule del tessuto mammario stimoli verso la proliferazione in senso neoplastico. Quello che ancora mancava per completare il quadro finora delineato, era la possibile esistenza di una relazione tra tali alterazioni genomiche ed una specifica distinzione in sottotipi.

Dopo pochi anni Perou *et al.* (2000) contribuirono ad inserire il tassello mancante. Nel loro studio, infatti, analizzarono i pattern di espressione in campioni di normale tessuto mammario e di tessuto neoplastico da 42 individui (36 carcinomi duttali infiltranti, 2 carcinomi lobulari, 1 carcinoma duttale *in situ*, 1 fibroadenoma e 3 campioni di mammella normale). Fu preparato per ciascun campione sperimentale cDNA marcato con cromogeno fluorescente (Cy5) da mRNA. Tale comune “riferimento” funse da controllo interno, la cui espressione genica di ogni campione fu comparata.

Per raggruppare i geni sulla base delle loro affinità di pattern fu utilizzato un metodo di hierarchical clustering. Le caratteristiche più evidenti che si ottennero dai patterns di espressione dei geni di questi tumori furono tre. Primo, le neoplasie mostravano una grande differenza nei loro pattern. Secondo, tale variazione era multidimensionale, in pratica molti differenti set di geni mostravano principalmente pattern di variazione indipendente. Terzo, che questi pattern avevano un ordine dominante riflettente le relazioni tra i geni stessi, relazioni tra i tumori e legami tra specifico gene e specifico tumore. Questo “ritratto molecolare” derivato dai pattern di

espressione dei geni rivelava non solo similitudini ed analogie non ancora scoperte tra i tumori, ma in molti casi mirava ad una interpretazione biologica. Variazioni nel grado di crescita, nell'attività di specifici sistemi di comunicazione, e nella composizione cellulare delle neoplasie erano tutte informazioni che potevano essere ottenute dalle corrispondenti variazioni nell'espressione di specifici sottotipi di geni. Il numero di ben definiti fenotipi molecolari osservati suggeriva che comunque si era lontani dall'avere un quadro completo della eterogenicità dei tumori al seno. Quando centinaia (invece di decine) di tumori saranno caratterizzati, verrà probabilmente alla luce una classificazione maggiormente accurata, con differenze statisticamente significative tra parametri clinici (Perou *et al.*, 2000). Anche se presentante questo limite, lo studio di Perou *et al.* (2000) aveva comunque fornito la possibilità di identificare 4 gruppi di campioni che potevano essere messi in relazione con differenti caratteristiche molecolari della biologia dell'epitelio mammario: in particolare, tali gruppi erano: Recettore per gli Estrogeni (ER)+/luminal-like, basal-like, ERB-B2+ e mammella normale (Perou *et al.*, 2000).

Un anno dopo Sørli *et al.* (2001) sopperirono ai limiti che erano risaltati nel lavoro di Perou *et al.* (2000). Essi infatti rifinirono la precedente classificazione analizzando un maggior numero di tumori ed indagarono sul valore clinico di ogni sottotipo, ricercando possibili correlazioni tra patterns di espressione dei geni e parametri clinicamente rilevanti (Sørli *et al.*, 2001). Usando un set intrinseco di geni di 456 cloni di cDNA, selezionato per identificare in maniera ottimale le caratteristiche intrinseche dei tumori al seno, analizzarono tramite hierarchical clustering 78 carcinomi, tre tumori benigni e sette campioni di mammella normale. Come si evince dalla FIGURA 1, i tumori furono separati in due branche principali. La branca sinistra conteneva i tre sottogruppi precedentemente definiti da Perou *et al.* (2000). Tali gruppi erano tutti caratterizzati da una bassa ad assente espressione dell'ER e da numerosi ed ulteriori fattori di trascrizione espressi nel cluster luminal/ER+. Il sottotipo basal (Fig.1, rosso) si caratterizzava per una elevata espressione di cheratina 5 e 17, laminina, e proteina legante acido grasso 7, mentre il sottotipo ERB-B2+ (Fig.

1, rosa) mostrava un'alta espressione di numerosi geni nel segmento ERB-B2. I campioni inclusi fra il gruppo di mammella normale (Fig. 1, verde) esibivano la maggior espressione di geni conosciuti per essere presenti nel tessuto adiposo e in altri tipi cellulari non-epiteliali. Questo ultimo gruppo presentava inoltre una forte espressione di geni dell'epitelio basale mentre era bassa quella dei geni dell'epitelio luminale. L'aumento delle dimensioni del campione ha quindi permesso la separazione del precedentemente definito gruppo ER+/luminal, in due o probabilmente tre distinti sottogruppi (branca destra). Il gruppo dei 32 tumori (denominati luminal A, Fig.1, blu scuro) mostrava la maggior espressione del gene ER. Il secondo gruppo di neoplasie positive per i geni luminal poteva essere distinto, a sua volta, in due minori entità, un piccolo gruppo denominato luminal B (Fig. 1, giallo) ed un gruppo di 10 tumori chiamato luminal C (Sørli *et al.*, 2001).

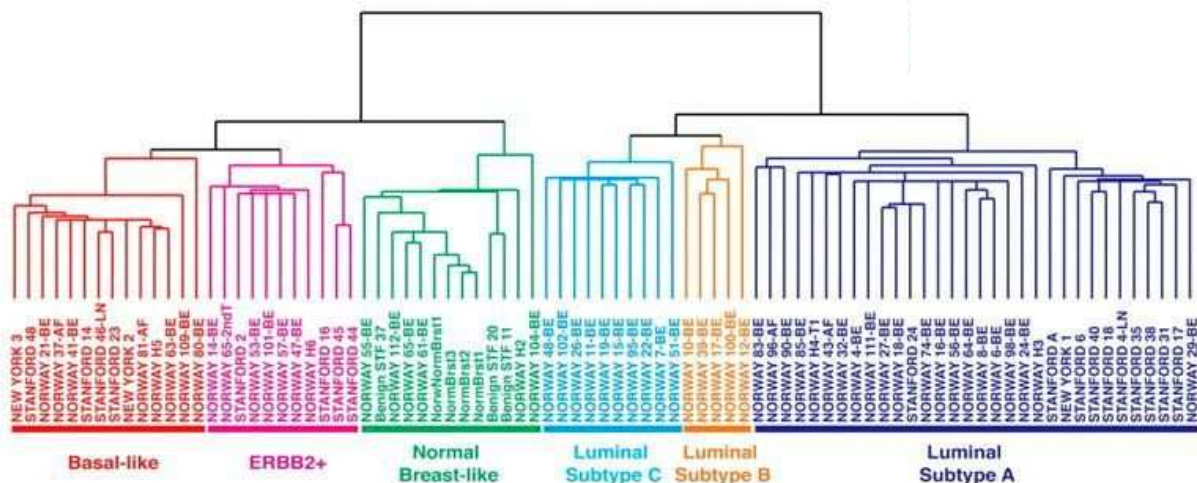


FIGURA 1. Pattern di espressione dei geni di 85 campioni sperimentali rappresentati da 78 carcinomi, tre tumori benigni, e quattro di tessuto normale, analizzati tramite hierarchical clustering usando 476 set di cloni di cDNA. I campioni di tumori sono stati divisi in cinque (o sei) sottotipi basati sulle diverse espressioni di geni. Il dendrogramma dei gruppi mostra i cinque (sei) sottotipi dei tumori, così colorati: sottotipo luminal A, blu scuro; sottotipo luminal B, giallo, sottotipo luminal C, azzurro; mammella normale, verde; basal-like, rosso; e ERB-B2+, rosa. (da Sørli *et al.*, 2001; mod.)

Fu soltanto nel 2003 che si arrivò al numero definitivo di sottotipi, grazie sempre a *Sørлие et al.* che contribuirono a fornirne il numero attualmente riconosciuto. Nel loro lavoro, infatti, aumentarono ulteriormente il numero di geni intrinseci da valutare portandolo a 534, caratterizzando 115 tumori maligni, e dimostrando che era possibile suddividerli in un basal-like, un ERB-B2+, due luminal-like (A e B), ed un sottogruppo di mammella normale (*Sørлие et al.*, 2003)(FIGURA 2).

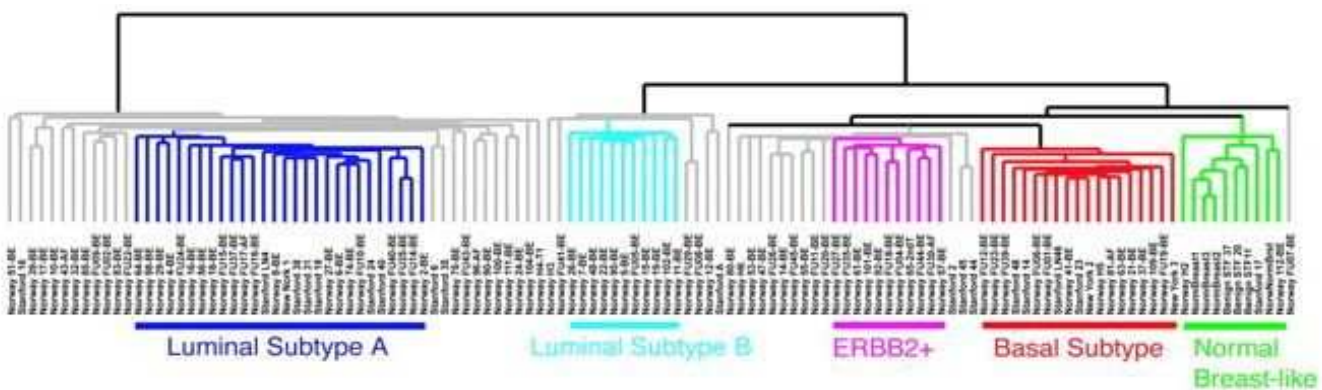


FIGURA 2. Hierarchical clustering di 115 tumori e 7 campioni di tessuto normale utilizzando un set di geni intrinseci di 534 cloni di cDNA (da *Sørлие et al.*, 2003; mod.)

2.2- DAI GENI AGLI ANTIGENI

Gli obiettivi finora raggiunti con le metodiche di indagini genomiche molecolari avevano posto, con decisione, le basi per un diverso approccio alle neoplasie al seno, determinando come vedremo, un forte interesse nei confronti di questo sistema classificativo. I motivi sicuramente sono da collegare alle possibili implicazioni a livello prognostico e terapeutico che tale metodo possedeva, ma rimanevano ancora delle perplessità, o meglio, dei limiti. Uno di essi era rappresentato dalle difficoltà tecniche che numerosi laboratori non attrezzati, o non specializzati, incontravano nei confronti delle metodiche diagnostiche finora utilizzate. Altro problema coinvolgeva il versante economico, in quanto i costi da sostenere per valutare i pattern di espressione dei geni, non sempre si rivelavano accessibili.

Un sistema alternativo e più economico poteva essere considerato una metodica immunoistochimica “surrogata”, da utilizzare per la valutazione dei profili di espressione (Nielsen *et al.*, 2004).

Inoltre, i livelli di mRNA non sempre corrispondono ad una variazione nell'espressione delle proteine oltre al fatto che la qualità della proteina dipende non solo dalla quantità e dal grado di trascrizione e traslazione, ma anche dalla degradazione e dal grado di trasporto da parte delle cellule. In più, i tessuti utilizzati per valutare i profili di mRNA includono sia cellule stromali, sia tumorali. Quindi metodiche di tipo immunoistochimico potrebbero risultare maggiormente utili nell'identificare lo status dell'espressione delle proteine e la loro specifica localizzazione (Kim *et al.*, 2006).

Un anno dopo, Yang *et al.*, ridefinirono la suddivisione in sottotipi, applicando un pannello di anticorpi costituito da anticorpi anti-recettore per gli estrogeni (ER), -recettore del progesterone (PR), -ERB-B2 e -citocheratina 5 (CK5). I sottotipi

tumoriali furono allora così suddivisi a seconda della immunoreattività a questi anticorpi (Yang *et al.*, 2007)(TABELLA 1):

- luminal A (ER+ e/o PR+, ERB-BR2-, qualsiasi CK5)
- luminal B (ER+ e/o PR+, ERB-B22+, qualsiasi CK5)
- HER2+ (ER-, PR-, ERB-B22+, qualsiasi CK5)
- basal-like (ER-, PR-, ERB-B22-, CK5+)
- non-classificati o normal-like (negativi per tutti i markers)

	ER		PR	ERB-B2	CK5
Luminal A	+	e/o	+	-	qualsiasi
Luminal B	+	e/o	+	+	qualsiasi
ERB-B2+	-		-	+	qualsiasi
Basal-like	-		-	-	+
Normal-like	-		-	-	-

TABELLA 1. Suddivisione del tumore al seno in sottotipi a seconda della immunoreattività ad un pannello di anticorpi costituito da: recettore per gli estrogeni (ER); recettore per il progesterone (PR); Human epithelial growth factor receptor 2 (ERB-B2); citocheratina 5 (CK5).

2.3- LA SOPRAVVIVENZA BASATA SULLA SUDDIVISIONE IN SOTTOTIPI

La ricerca di una nuova classificazione del tumore al seno è stata dettata, come accennato in precedenza, dalla presenza di alcuni limiti che il corrente sistema tassonomico possedeva. Primo fra tutti, il fatto che tale gruppo di neoplasie si è sempre caratterizzato per una elevata eterogeneità, essendo il tumore al seno un gruppo di patologie particolarmente diverse in termini di presentazione, morfologia, profilo molecolare e risposta alla terapia (Rakha *et al.*, 2008) ed una classificazione effettuata puramente su base morfologica non contribuiva a limitare le differenze che esistono tra tumori appartenenti ad uno stesso sottotipo. Tale disomogeneità, da un lato potrebbe rivelarsi fattore di poco conto, se si considera il problema soltanto dal punto di vista tassonomico, ma si rivela di enorme importanza se applicando una classificazione ci si pone come obiettivo quello di fornire indicazioni sul comportamento biologico della neoplasia.

Furono Sørli *et al.* che nel 2001 cercarono delle possibili implicazioni cliniche legate alla suddivisione in base ai profili genomici, essi infatti eseguirono delle analisi di sopravvivenza comparate tra i sottotipi per quello che riguarda la sopravvivenza globale ed il tempo “libero da recidiva” o di relapse free (FIGURA 3). Le curve di Kaplan-Meier mostravano una elevata differenza significativa nella sopravvivenza globale tra i sottotipi, ed in particolare i sottotipi basal-like ed ERB-B2+ si dimostrarono associati a tempi di sopravvivenza ridotti (FIGURA 3A). Simili risultati si ottennero per quel che riguardava il tempo di relapse free (FIGURA 3B).

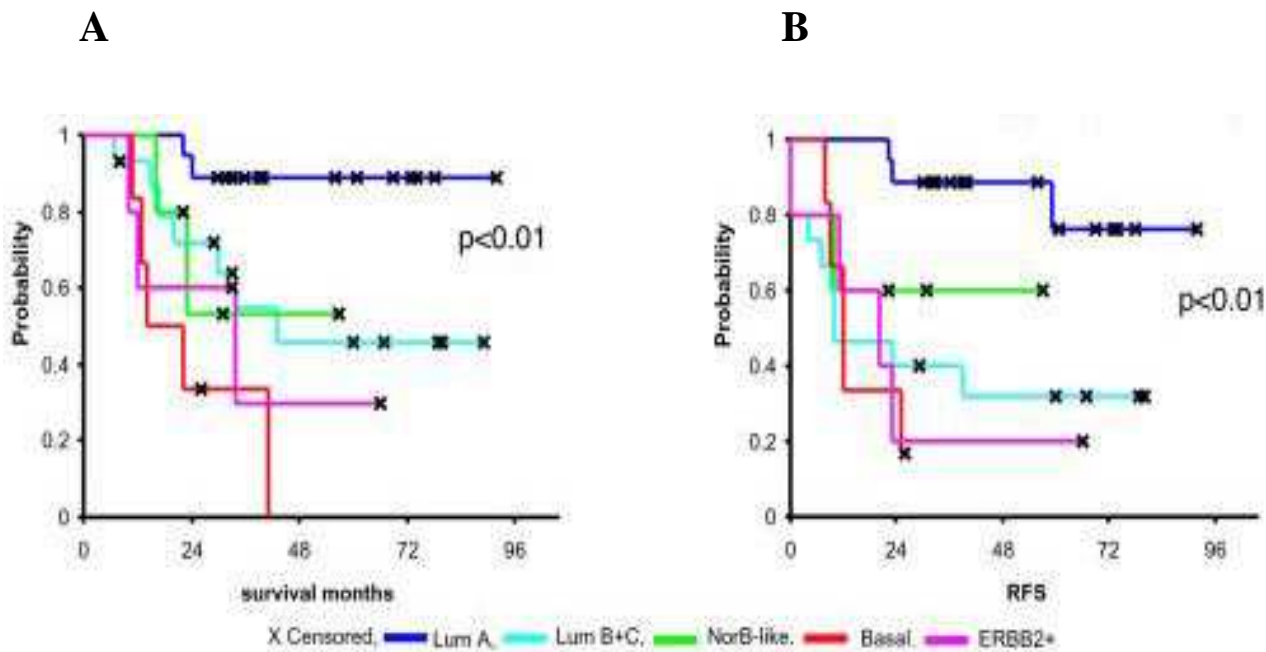


FIGURA 3. Analisi del tempo di sopravvivenza globale e di relapse free di 49 pazienti con tumore al seno, classificati in base alla differente espressione genica. (A) Sopravvivenza globale e (B) tempo di RELAPSE FREE (da Sørli *et al.*, 2001; mod.)

In uno studio successivo si indagò anche se gli stessi sottotipi potessero essere associati a differenze significative nelle curve di Kaplan-Meier riguardo al tempo di sviluppo di metastasi (Sørli *et al.*, 2003). Come mostrato in FIGURA 4, la probabilità di rimanere in condizioni di disease-free erano significativamente differenti tra i sottotipi; pazienti con tumori del tipo luminal A vivevano considerevolmente più a lungo prima che sviluppassero patologie metastatiche, mentre i gruppi basal-like ed ERB-B2+ esibivano un intervallo di tempo libero dalla patologia molto più breve (Sørli *et al.*, 2003).

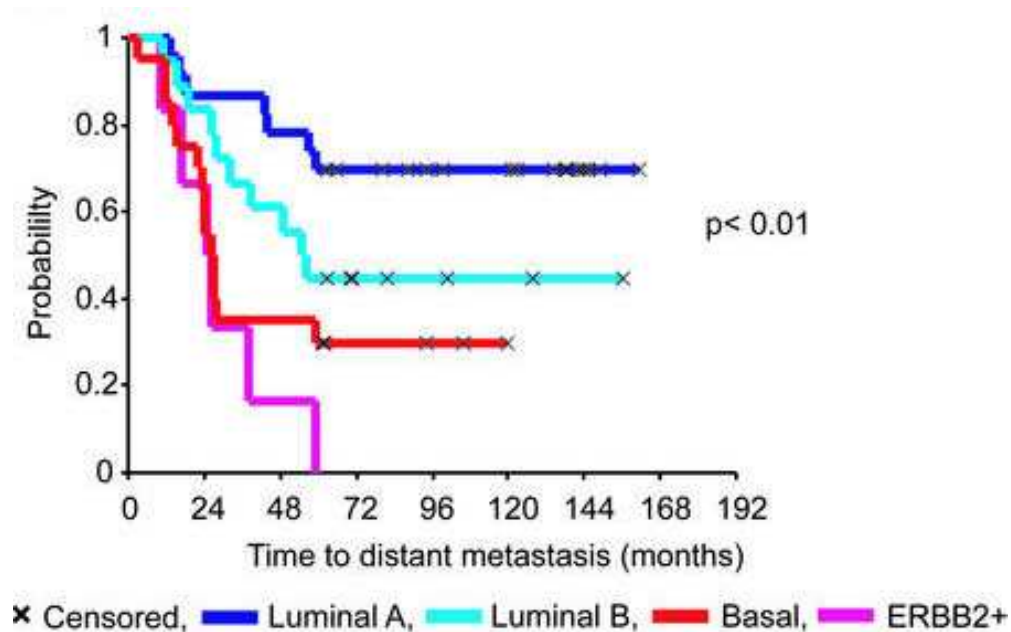


FIGURA 4. Curve di Kaplan-Meier per il tempo di sviluppo di metastasi in pazienti suddivisi a seconda del sottotipo molecolare (da Sørli *et al.*, 2003; mod.)

Le differenti classi molecolari di tumore al seno esibivano inoltre una diversa sensibilità alla chemioterapia preoperatoria. I sottotipi basal-like ed ERB-B2+ avevano il più alto indice di completa remissione (CR) patologica: 45%; i tumori luminal e normal-like invece possedevano il più basso grado di CR patologica: 6% e 0% rispettivamente (Rouzier *et al.*, 2005). Questi risultati indicarono che le differenti classi tumorali non erano diverse soltanto in termini di prognosi ma mostravano differenze anche per quel che riguarda la sensibilità a protocolli chemioterapici, infatti i sottotipi basal-like ed ERB-B2+ sono risultati maggiormente sensibili a protocolli che includevano paclitaxel e doxorubicina rispetto ai luminal ed ai normal-like (Rouzier *et al.*, 2005).

Oltre alla sopravvivenza globale, al tempo di relapse free, al tempo di sviluppo di processi metastatici e alla risposta a specifici protocolli chemioterapici, si è cercato anche di determinare se i sottotipi molecolari mostravano recidive preferenziali in organi distanti. Si scoprì così che, analizzando il legame tra sottotipi e dati clinici, la localizzazione delle recidive distanti non era distribuita casualmente (Smid *et al.*,

2008). I risultati di questo studio sono riportati in TABELLA 2, dove si può osservare come l'incidenza di recidive a livello osseo riguarda in maniera predominante i sottotipi luminal, mentre per quel che riguarda il cervello si assiste ad una prevalenza di basal-like; infine, una recidiva pleurica, anche se rara, è stata descritta solo per il gruppo dei luminal.

SOTTOTIPO	SITO DI RECIDIVA					TOTALE
	OSSA	POLMONE	FEGATO	CERVELLO	PLEURA	
LUMINAL B	26	11	2	1	5	45
LUMINAL A	22	2	4	1	5	34
ERB-B2+	14	4	6	3	0	27
NORMAL	4	1	2	1	1	9
BASAL-LIKE	5	12	4	8	1	30
TOTAL	71	30	18	14	12	145

TABELLA 2. Frequenza del sito di recidiva dei sottotipi molecolari (da Smid *et al.*, 2008; mod.)

Per caratterizzare ulteriormente e per comprendere al meglio i sottotipi individuati, Hu *et al.* (2006) cercarono di determinare se potesse esistere un'associazione tra gli stessi sottotipi ed il grado, lo status linfonodale, il profilo degli ER, l'età e le dimensioni del tumore in un set di test combinati. Le analisi di tabelle di contingenza a due vie hanno mostrato una significativa associazione tra il grado e il sottotipo, in particolare i tumori ERB-B2+/ER- e basal-like erano prevalentemente appartenenti a neoplasie di terzo grado (TABELLA 3).

SOTTOTIPO				
	LUM A (#di pazienti)	LUM B (#di pazienti)	ERB-B2+ (#di pazienti)	BASAL-LIKE (#di pazienti)
GRADO				
1	29	2	0	1
2	45	26	6	16
3	15	32	21	67

TABELLA 3. Associazione tra grado istologico e sottotipo in un set di test combinato di 315 campioni. $p < 0.0001$. (da Hu *et al.*, 2006; mod.)

Altre analisi di tabelle di contingenza a due vie non hanno evidenziato associazioni significative tra lo status linfonodale ed il sottotipo ($p=0.44$), associazioni riscontrate invece tra il profilo degli ER e sottotipo ($p < 0.0001$) e tra le dimensioni del tumore ed il sottotipo ($p=0.01$). Come ci si aspettava, i tumori ER+ erano rappresentati prevalentemente da Luminal A e Luminal B (Hu *et al.*, 2006). Per determinare un legame tra età e sottotipo, venne utilizzato un test t di Student, per comparare l'età media di diagnosi di ciascun sottotipo tumorale. Risultato interessante, fu quello di notare che l'età media di diagnosi di tumori ERB-B2+/ER- era significativamente minore rispetto a quella degli altri sottotipi. L'età media di diagnosi dei Luminal A era significativamente maggiore di quella dei Luminal B (Hu *et al.*, 2006).

Pazienti con tumore al seno con lo stesso profilo diagnostico e prognostico possono avere esiti clinici marcatamente differenti (Sotiriou *et al.*, 2003). Queste differenze sono probabilmente determinate dai limiti presenti in questa classificazione, nella quale vengono inseriti gruppi di patologie distinte a livello molecolare in classi cliniche basate unicamente sulla morfologia (Sotiriou, 2003).

Inoltre, le differenze molecolari tra i sottotipi tumorali sono spesso accompagnate da differenti caratteristiche cliniche, come variazioni statisticamente consistenti nel

tempo di relapse free e nella sopravvivenza generale (Alizadeh *et al.*, 2000; Sørлие *et al.*, 2001).

Quindi, la maggiore utilità che la classificazione effettuata inizialmente su base genomica, e poi adattata per motivi pratici e per semplificare le indagini diagnostiche utilizzando pannelli immunoistochimici surrogati, si poteva ascrivere alle implicazioni cliniche offerte da tale sistema. Il principale obiettivo nel campo della genomica tumorale è infatti quello di provare a rispondere alle importanti domande del clinico su quale tumori avrebbero attitudini aggressive, quali tumori resterebbero inattivi, quali pazienti necessiterebbero e meno di terapie sistemiche e quali tipo di farmaci dovrebbero essere usati (Sørлие, 2004).

Applicando la nuova classificazione si è raggiunto un importante risultato, si è arrivati ad una stabilità, una omogeneità ed una unicità del ritratto molecolare fornita dall'analisi dell'espressione dei pattern dei geni. Infatti, questi ritratti rappresentano fedelmente il tumore stesso, e non semplicemente un particolare campione del tumore, in quanto è possibile riconoscere un pattern di espressione caratteristico di un tumore in campioni indipendenti (Sørлие, 2004).

Si è accennato in precedenza al legame che unisce la suddivisione in sottotipi molecolari all'applicazione di specifici protocolli terapeutici, realizzati a seconda del gruppo molecolare individuato. A tale proposito esistono numerosi studi in letteratura, in cui si cerca di dimostrare l'efficacia di combinazioni di chemioterapici sui sottotipi di carcinoma al seno, in particolare l'attenzione si è rivolta verso le categorie più aggressive, come i tumori basal-like. Mullan e Millikan (2007), considerata la forte sovrapposizione tra questo gruppo di tumori con quelli presentanti mutazioni a livello di BRCA segnalata da Sørлие *et al.* (2003), ipotizzarono che tali alterazioni molecolari potrebbero essere sfruttate per delineare specifiche terapie. Lo stretto legame dei basal-like e dei tumori con mutazioni del BRCA1 e con l'espressione dell'EGFR suggerirebbe che gli inibitori dell'EGFR-tirosina chinasi potrebbero costituire una valida opzione terapeutica per questo sottotipo di tumore al seno (Mullan e Millikan, 2007). Un altro fattore che viene

preso in considerazione da Mullan e Millikan (2007), è la presenza del recettore c-kit tirosina chinasi (CD117). Tale marker è segnalato in associazione con un particolare sottotipo di tumore basal-like, denominato carcinoma adenoide cistico del seno, dimostratosi estrogeno-, progesterone-, ed ERB-B2-negativo (Azoulay *et al.*, 2005). Il c-kit è stato sfruttato, precedentemente, per la terapia dei tumori gastro-intestinali stromali (GIST), in virtù del fatto che tali neoplasie mostravano una elevata sensibilità e risposta clinica all'imatinib/Gleevec, l'inibitore della tirosina chinasi specificatamente progettato contro la chinasi bcr/abl nella leucemia mieloide cronica (Mullan e Millikan, 2007). Tuttavia, l'efficacia del c-kit come bersaglio nella terapia del tumore al seno basal-like, o il suo ruolo come marker predittivo di una risposta terapeutica rimangono ancora soltanto delle ipotesi, dal momento che i risultati dipenderebbero in grande misura dalla prevalenza del c-kit nei basal-like, dubbi che si sollevano anche sul ruolo del c-kit stesso nella progressione della patologia (Mullan e Millikan, 2007).

Numerose ulteriori alterazioni molecolari associate con i basal-like offrono delle opportunità per nuovi approcci terapeutici. La perdita del gene onco-soppressore della fosfatasi-tensina omologo (PTEN), è stata riportata come un comune evento nei tumori al seno negativi per l'ER e l'ERB-B2 (Saal *et al.*, 2005; Yehiely *et al.*, 2006). Ciò suggerisce che la perdita del controllo sulla via del segnale PI3K/AKT (rete di trasduzione di segnali di sopravvivenza e proliferazione cellulare e progressione tumorale) potrebbe essere alla base dell'aggressività del fenotipo basal-like, trattabile quindi con inibitori del PI3K/AKT (Mullan e Millikan, 2007). Inoltre, il 45% dei basal-like esprime anche una piccola heat-shock protein, la $\alpha\beta$ -cristallin, un predittore indipendente di scarsa sopravvivenza (Moyano *et al.*, 2006). Una elevata espressione della $\alpha\beta$ -cristallin conduce ad un aumento del fenotipo tumorale, una maggiore migrazione ed invasione cellulare e partecipa all'attivazione del MEK (Moyano *et al.*, 2006). La via PI3K/AKT sembra essere anche attivata da una elevata espressione della $\alpha\beta$ -cristallin (Moyano *et al.*, 2006), proteina dimostrata essere coinvolta nell'inibizione dell'apoptosi attraverso l'interruzione del meccanismo di

attivazione della morte cellulare, inibendo l'attivazione della caspasi 3 (Mullan e Millikan, 2007). Molto interessante è il fatto che gli inibitori del MEK bloccano il fenotipo $\alpha\beta$ -cristallin e potrebbero quindi rappresentare un promettente segnale interferibile farmacologicamente (Moyano *et al.*, 2006).

Probabilmente il marker predittivo maggiormente affidabile nei carcinomi basal-like potrebbe essere l'espressione dei livelli di BRCA1 (Mullan e Millikan, 2007). Il BRCA1 è considerato un importante fattore sia per la chemioterapia danneggiante il DNA ed i microtubuli, sia per studi preclinici e clinici (Mullan *et al.*, 2006).

La presenza di mutazioni del BRCA1 nelle neoplasie predice una miglior risposta ad una chemioterapia danneggiante il DNA, come una chemioterapia basata su antracicline (Delaloge *et al.*, 2002). In contrasto, modelli preclinici hanno mostrato che la presenza di BRCA1 wild-type, conferisce una maggiore sensibilità ad agenti danneggianti i microtubuli, come paclitaxel ed alcaloidi della vinca (Quinn *et al.*, 2003). Una minor espressione del BRCA1 (come nei tumori basal-like) potrebbe conferire una risposta alla chemioterapia simile a quella dei tumori con mutazioni del BRCA1 (Mullan e Millikan, 2007).

2.4- LIMITI DELLA CLASSIFICAZIONE

L'importanza biologica di questa classificazione si concentrava quindi su due importanti osservazioni: primo, la possibilità di suddividere ogni tipo di tumore in gruppi caratterizzati da distinti profili dei geni, e secondo, il fatto che tale classificazione apporta informazioni prognostiche (Sørli *et al.*, 2006). Queste analisi, tuttavia possiedono un limitato valore nei riguardi della risposta terapeutica attesa in singoli pazienti. Un fattore prognostico è tradizionalmente associato con la sopravvivenza globale e il tempo di disease-free (in assenza di terapia sistemica adiuvante) mentre un fattore predittivo, predice la risposta, o meno, ad un particolare trattamento (Lonning, 2003). Anche se sono stati individuati numerosi fattori prognostici del tumore al seno, nessun fattore predittivo è stato finora universalmente riconosciuto, con l'eccezione del recettore per l'estrogeno- α ed il recettore del progesterone, nei confronti di una terapia endocrina e l'ERB-B2 per il trattamento con trastuzumab (Sørli *et al.*, 2006). In risposta a questo limite, Sørli *et al.* (2006), provarono a verificare se si potevano identificare particolari espressioni di geni associate ad una risposta o a resistenza verso la chemioterapia. Tuttavia utilizzando, multipli e diversi metodi di analisi, non riuscirono a caratterizzare un profilo di geni che fosse altamente accurato nel determinare tumori né farmaco-sensibili, né farmaco-resistenti. I sottotipi molecolari erano scarsamente correlati con la risposta, in particolare i tumori luminal A mostravano un basso tasso di progressione tumorale mentre i luminal B trattati con doxorubicina esibivano un alto grado di progressione della patologia. In conclusione, non si riuscì a dimostrare finora che i profili di espressione dei geni potevano essere usati per predire con accuratezza una risposta alla chemioterapia (Sørli *et al.*, 2006).

Questi risultati indicano che analisi di campioni di dimensioni relativamente piccole e con incompleta validazione non possono rivelare profili di geni con un sufficiente

potere predittivo tale da essere di ausilio per il clinico e suggeriscono che analisi genomiche che utilizzano microarray potrebbero aver bisogno di un approccio differente che comprenda ipotesi funzionali (Lønning *et al.*, 2005) per la determinazione della sensibilità ad una terapia (Sørli *et al.*, 2006).

Oltre al problema dei campioni di piccole dimensioni, un ulteriore problema in questo ambito risiede nella riproducibilità dei pattern di espressione dei geni (Peppercorn *et al.*, 2008). Differenti metodiche di processazione del tessuto possono determinare diversi pattern di espressione (Reis-Filho *et al.*, 2006). Un esperimento condotto su analisi volte a predire la risposta alla terapia con tamoxifene ha rivelato che l'espressione di diversi geni era differente a seconda che il campione era stato ottenuto tramite laser capture microdissection oppure processando l'intero tessuto (Ma *et al.*, 2004). Tali variazioni potrebbero rivelarsi molto più che un problema, nel tentativo di definire uno specifico piccolo sottoinsieme di geni che predica una valida prognosi, rispetto agli intenti di definire una prognosi o una risposta ad una terapia basata su sottotipi molecolari definiti dall'espressione di centinaia di geni (Reid *et al.*, 2005).

Ulteriori difficoltà risultano dai complicati metodi statistici adottati per analizzare l'espressione dei geni. Infatti i modelli predittivi proposti in assenza di una rigorosa valutazione statistica o una validazione esterna, dovrebbero essere considerati solamente come contributi ipotetici, non sufficientemente dimostrati per incidere sulla pratica clinica (Peppercorn *et al.*, 2008).

Un altro motivo di dibattito, riguarda la definizione dei carcinomi basal-like. Numerosi autori definiscono i basal-like come “triple negative”, alla luce della loro triplice reazione negativa ai marcatori PR, ER, e ERB-B2. Irvin e Carey (2008), tuttavia, sostengono che tali entità siano differenti, infatti, anche se la maggior parte dei tumori triple-negative vengono raggruppati tra i carcinomi basal-like (Nielsen *et al.*, 2004), essi non sono sinonimi. Il termine “triple negative” si basa su prove cliniche nei riguardi di ER, PR e ERB-B2, mentre “basal-like” si riferirebbe al fenotipo molecolare (Irvin e Carey, 2008). Anche se la maggior parte dei tumori

triple negative possiede un profilo di espressione basal-like e quasi la totalità dei basal-like risulta triple negative, entrambe le categorie hanno fino al 30% di discordanza (Kreike *et al.*, 2007; Bertucci *et al.*, 2008). Se l'analisi dei profili di espressione utilizzando geni intrinseci viene considerato il gold standard per l'identificazione dei tumori basal-like, si potrebbe asserire che la maggior parte dei basal-like risulterebbe negativa per l'espressione dei recettori ormonali e l'ERB-B2. Tuttavia, in due studi nei quali veniva analizzata l'espressione dei recettori ormonali in neoplasie classificate secondo una lista di geni intrinseci, l'espressione del ER era osservata dal 5% al 45% dei tumori basal-like (Rakha *et al.*, 2008). Inoltre, Rouzier *et al.* (2005), hanno dimostrato che il 14% dei basal-like esprimeva anche l'ERB-B2.

3- IL TUMORE MAMMARIO DELLA CAGNA

3.1- CENNI GENERALI

Le neoplasie mammarie rappresentano la metà di tutti i tumori della cagna, circa il 40-50% di esse viene considerata maligna (Benjamin *et al.*, 1999; Bergh *et al.*, 1995; Rutteman *et al.*, 2001) ed occupano il secondo posto, dopo quelle cutanee, tra i più comuni tumori del cane (Moulton, 1990). L'incidenza è estremamente elevata in quelle aree dove una precoce ovariectomia delle cagne (prima dei due anni) non viene eseguita come pratica clinica di routine (Perez Alenza *et al.*, 2000). Il tasso di incidenza annuale in femmine non sterilizzate è stato stimato essere approssimativamente di 260/100.000 animali a rischio, secondo uno studio condotto in California (Dorn *et al.*, 1968). Sono primariamente colpite cagne di mezza età (in media dai 9 agli 11 anni) ed un aumento dell'incidenza si ha a partire da circa 6 anni (Perez Alenza *et al.*, 2000).

Esiste molto disaccordo per quello che riguarda la diagnosi delle neoplasie mammarie, per le quali sono state proposte numerose classificazioni su base morfologica (Cotchin, 1958; Fowler *et al.*, 1974; Hampe e Misdorp, 1974; Monlux *et al.*, 1977; Moulton, 1990); questa carenza di una nomenclatura standardizzata su base istogenetica ha notevolmente complicato la valutazione comparata dei risultati di studi sul comportamento biologico di tumori maligni, ed in particolare quelli di origine epiteliale (Benjamin *et al.*, 1999).

Varie prove sono state effettuate per la ricerca di fattori prognostici in patologie maligne della ghiandola mammaria, come l'uso di specifici sistemi di classificazione morfologica e di stadiazione (Gilbertson *et al.*, 1983; Fowler *et al.*, 1974; Misdorp e Hart, 1976), valutazione di parametri a livello di DNA cellulare (Hellmén *et al.*, 1993; Hellmén *et al.*, 1988), conta delle regioni dell'organizzatore nucleolare (Bostock *et al.*, 1992; Bratulic *et al.*, 1996) ed espressione di oncogeni (Ahern *et al.*,

1996; Schafer *et al.*, 1998). Anche se alcuni di questi approcci hanno dimostrato dei chiari legami tra variazioni morfologiche o molecolari e grado di malignità del carcinoma mammario, nessuno di questi sistemi si è rivelato di ampio utilizzo da parte della comunità di diagnostica patologica (Benjamin *et al.*, 1999).

Un efficace trattamento a seguito di una accurata e tempestiva procedura diagnostica si dimostra di primaria importanza per questo tumore. Mediante intervento chirurgico, circa il 48% dei cani muore o viene sottoposto ad eutanasia anche entro 1 anno dopo la chirurgia, a causa della recidiva o della diffusione metastatica (Graham e Myers, 1999). Nonostante le approfondite ricerche nel campo clinico-patologico, molto poco si conosce sulla prognosi e sulle cause dei tumori mammari del cane (Benjamin *et al.*, 1999). Anche le più minuziose metodiche cliniche e patologiche sono soggette a numerosi errori, oltre al fatto che la diagnostica per immagini non si rivela sensibile ad un precoce sviluppo neoplastico (Popov *et al.*, 1997).

Si rende quindi necessario un accurato supporto prognostico per l'identificazione di animali ad elevato rischio (Lee *et al.*, 2004).

3.2- LA CLASSIFICAZIONE

Esistono numerosi sistemi di classificazione istologica per i tumori mammari maligni del cane (Fowler *et al.*, 1974; Gilbertson *et al.*, 1983), ma, nonostante i numerosi tentativi fatti nell'ultimo trentennio per modificare l'originaria versione proposta dalla World Health Organization (WHO) nel 1974, non ha ancora trovato unanime consenso (Marcato, 2002).

L'ultima classificazione della WHO, che è l'unica accettata e riconosciuta dalla maggior parte dei patologi (Hampe e Misdorp, 1974), è stata recentemente sostituita da una nuova, la WHO-IHCTDA (World Health Organization - International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals-1999) (FIGURA 5) (Misdorp *et al.*, 1999).

Il valore di questi sistemi classificativi viene stabilito nei riguardi della possibilità di predire il comportamento biologico dei tumori a seguito dell'escissione chirurgica (Perz Alenza *et al.*, 2000).

<p>1. Tumori maligni</p> <p>1.1 Carcinoma non infiltrante (in situ)</p> <p>1.2 Carcinoma complesso</p> <p>1.3 Carcinoma semplice</p> <p> 1.3.1 Carcinoma tubulo-papillare</p> <p> 1.3.2 Carcinoma solido</p> <p> 1.3.3 Carcinoma anaplastico</p> <p>1.4 Tipi speciali di carcinoma</p> <p> 1.4.1 Carcinoma a cellule fusate</p> <p> 1.4.2 Carcinoma squamoso</p> <p> 1.4.3 Carcinoma mucoso</p> <p> 1.4.4 Carcinoma a cellule ricche in lipidi</p> <p>1.5 Sarcomi</p> <p> 1.5.1 Fibrosarcoma</p> <p> 1.5.2 Osteosarcoma</p> <p> 1.5.3 Altri sarcomi</p> <p>1.6 Carcinosarcoma</p> <p>1.7 Carcinoma o sarcoma in tumore benigno</p>	<p>2. Tumori benigni</p> <p>2.1 Adenoma</p> <p> 2.1.1 Adenoma Semplice</p> <p> 2.1.2 Adenoma complesso</p> <p> 2.1.3 Adenoma basaloide</p> <p>2.2 Fibroadenoma</p> <p> 2.2.1 Fibroadenoma a bassa cellularità</p> <p> 2.2.2 Fibroadenoma ad alta cellularità</p> <p>2.3 Tumore misto benigno</p> <p>2.4 Papilloma duttale</p>
	<p>3. Tumori non classificati</p>
	<p>4. Displasie e iperplasie mammarie</p> <p>4.1 Iperplasia duttale</p> <p>4.2 Iperplasia lobulare</p> <p> 4.2.1 Iperplasia epiteliale</p> <p> 4.2.2 Adenosi</p> <p>4.3 Cisti</p> <p>4.4 Ectasia duttale</p> <p>4.5 Fibrosi focale (fibrosclerosi)</p> <p>4.6 Ginecomastia</p>

FIGURA 5. Classificazione istologica delle displasie e neoplasie mammarie della cagna secondo la WHO-International Classification of Tumours of Domestic Animals (da Misdorp *et al.*, 1999).

3.3- PROBLEMATICHE DI CLASSIFICAZIONE

I problemi connessi alla classificazione dei tumori mammari sono molteplici e possono essere così riassunti (Marcato, 2002):

1. vi è spesso una promiscuità di aspetti istologici riferibili a displasie, tumori benigni e maligni, che talvolta rendono difficile l'esatto inquadramento dei casi in un solo gruppo;
2. non sempre è delineabile una chiara distinzione tra aspetti benigni e maligni; molto spesso la partecipazione del mioepitelio o dello stroma crea "isolamenti" di cellule epiteliali tali da mimare l'aspetto di tumori infiltranti;
3. non è sempre disponibile la validazione prognostica del criterio classificativo utilizzato.

Il primo punto è relativo alla biologia del tumore mammario della cagna in cui sono frequenti espressioni contemporanee della progressione neoplastica. Questo punto non è insormontabile in quanto tra le raccomandazioni dell'ultima versione della WHO-IHCTDA 1999, vi è quella di considerare, ai fini dell'inquadramento della lesione, l'aspetto istologico più grave (malignità>benignità>displasia) o a parità di gravità quello maggiormente rappresentato. Circa il secondo punto, nella dubbia distinzione tra lesione benigna e maligna, viene raccomandato di focalizzare l'attenzione sull'esistenza di invasività, di focolai di necrosi, sul pleomorfismo, sul grado istologico, sulla quantità di mitosi. Circa il terzo punto, la raccolta di abbondanti dati per la validazione prognostica del tipo di classificazione impiegata ha permesso l'elaborazione della WHO-IHCTDA-1999 riportata in FIGURA 5 (Marcato, 2002).

Altri problemi sono connessi all'uso di individuali criteri diagnostici patologici, per cui la proporzione dei tumori maligni mammari del cane varia dal 26% al 73%, secondo studi differenti (Perez Alenza *et al.*, 2000).

Quindi, anche se l'attuale classificazione si è rivelata utile nel tentare di creare ordine in una delle neoplasie più complesse dal punto di vista diagnostico, rimangono ancora dei dubbi sulle reali indicazioni prognostiche che tale sistema offre al clinico.

Il tipo istologico di tumore viene considerato, infatti, un dato che riveste minore importanza come parametro prognostico rispetto alle dimensioni ed al grado (Kurzman e Gilbertson, 1986; Misdorp e Hart, 1976; Parodi, 1983). Anche se i sarcomi possiedono una peggiore prognosi rispetto ai carcinomi semplici, così come i carcinomi semplici rispetto ai carcinomi complessi, il coinvolgimento linfonodale risulta molto più importante che il tipo istologico, confermando l'alta influenza che ha l'invasività sulla sopravvivenza (Parodi, 1983).

Altre perplessità sulla classificazione del WHO si pongono nei confronti delle neoplasie con coinvolgimento e proliferazione del mioepitelio, i cosiddetti tumori complessi e misti.

Uno studio di Benjamin *et al.* (1999), basato su indagini del Collaborative Radiological Health Laboratory (CRHL) alla Colorado University, dal 1964 fino agli inizi del 1990, condotte su osservazioni per tutta la durata della vita di 672 Beagle femmina, permise un'analisi straordinariamente dettagliata sull'incidenza della neoplasia mammaria per tutta la vita di ogni singolo animale, includendo anche dati di follow-up su ciascuna lesione rimossa chirurgicamente. Ciò permise loro di riclassificare i tumori epiteliali mammari con lo scopo di includere le caratteristiche morfologiche ed attitudinali osservate nei cani. Tale metodo incorporò dei concetti estratti sia dalla classificazione di Moulton (1990), sia da quella del WHO di Hampe e Misdorp (1974), con delle sostanziali differenze dall'originale schema del WHO. Prima fra tutte, i fibroadenomi e i tumori misti benigni furono separati, opponendosi all'inclusione degli ultimi come un sottotipo dei primi. Inoltre, fu abbandonato l'uso del termine "tumore misto maligno", poiché esisteva una certa confusione sull'uso di

questa accezione. Alcuni patologi lo utilizzavano per descrivere un tumore misto con una singola componente maligna, epiteliale o mesenchimale, ed altri, inclusi Moulton (1990) e Hampe e Misdorp (1974), per definire un tumore misto in cui una o entrambe le componenti si presentavano maligne. Lo schema del WHO utilizzava anche carcinosarcoma come sinonimo di tumore misto maligno, nonostante la connotazione di carcinosarcoma, implicante che dovevano essere coinvolte sia la componente carcinomatosa, sia quella sarcomatosa. Nella riclassificazione CRHL, le lesioni che possedevano una componente maligna in un tumore misto vennero denominate “carcinoma” o “sarcoma in tumore misto”, termine che rappresenta una designazione maggiormente accurata e comprensibile, anche dal punto di vista del significato biologico. Anche se questo potrebbe suggerire che questi caratteri di malignità derivino nel contesto di un tumore misto benigno, non esistono prove di tale meccanismo patogenetico, e la più semplice classificazione “in tumore misto” viene preferita a “che origina in un tumore misto”. Carcinosarcoma venne usato solo per lesioni nelle quali era presente malignità in entrambe le componenti, epiteliale e mesenchimale (Benjamin *et al.*, 1999).

E' evidente, quindi, che le indicazioni fornite dal WHO per la classificazione dei tumori mammari della cagna appaiono di indiscutibile utilità per un corretto inquadramento tassonomico della neoplasia, ma destano dubbi e perplessità, sia per quello che riguarda la questione più spinosa di questa patologia, ovvero la presenza della componente mioepiteliale, che frequentemente partecipa e contribuisce alla progressione del tumore, sia per quello che concerne lo scarso valore prognostico di tale modello classificativo.

3.4- LA CLASSIFICAZIONE UMANA E' LA SOLUZIONE?

Alla luce dei problemi che la classificazione dei tumori mammari della cagna del WHO ha suscitato nella comunità scientifica, e viste le implicazioni, sia dal punto di vista della diagnostica, sia per quello che riguarda le informazioni fornite al clinico sul possibile andamento prognostico che la classificazione su base molecolare adottata in medicina umana offre, è senza dubbio una sfida non priva di fascino, quella di poter applicare alla patologia veterinaria tale modello.

Le conseguenze di un possibile utilizzo della suddivisione in gruppi molecolari delle neoplasie mammarie del cane ovvierebbe alle lacune ed alle carenze che il sistema del WHO presenta. Primo di tutto, si riuscirebbero finalmente a raggruppare sotto una stessa categoria, neoplasie con diverse caratteristiche morfologiche ma con comportamenti biologici simili, evenienza che porterebbe ad una indicazione prognostica più immediata, anche senza la necessità di dover ricorrere ai classici indicatori dell'andamento di un tumore, come il grado, l'invasività, lo status ormonale e l'indice di proliferazione cellulare. Sull'utilità ed il valore di tali caratteristiche intrinseche della neoplasia, non esiste alcuna controindicazione tantomeno perplessità, essendo dimostrata la loro efficacia da numerosi studi presenti in letteratura. Il contributo, quindi, che porterebbe un nuovo sistema tassonomico, risulterebbe nella possibilità di poter fornire una diagnosi di tumore mammario maligno del cane, senza dover ricorrere a valutazioni talvolta soggettive sulla morfologia del tumore stesso, considerando che spesso, in uno stesso campione di mammella, coesistono aree con diversi pattern di proliferazione. La disomogeneità dei tumori mammari non è quindi soltanto relativa alla loro suddivisione in base alla morfologia, ma si dimostra una caratteristica relativa ad uno stesso campione di

tessuto, con coesistenza di diverse aree di differenziazione in seno ad uno stesso tumore. E' abilità del patologo, quella di riuscire ad identificare un pattern di crescita neoplastica prevalente, capacità indubbiamente soggettiva.

La possibilità di definire un patologia neoplastica a livello molecolare, prescinderebbe dalla presenza di elementi morfologici più o meno riconoscibili, oggettivando così l'indicazione diagnostica.

La classificazione in sottotipi su base molecolare in uso in medicina umana, è inoltre dotata di un forte valore prognostico, come risulta dagli studi di Sørli *et al.* (2001; 2003), la sua applicazione in medicina veterinaria aggiungerebbe quindi un ulteriore vantaggio: l'indirizzo diagnostico oltre ad essere più preciso sarebbe anche completo delle indicazioni prognostiche.

Altro aspetto importante da considerare, è la mancanza finora di conoscenze sulla carcinogenesi dei tumori mammari, ovvero da che tipologia cellulare derivino le neoplasie della mammella.

I tipi cellulari che hanno parte importante da soli o in associazione nel caratterizzare i diversi tipi di tumore sono: cellule epiteliali, mioepiteliali e fibroblasti dello stroma (l'evenienza di altre cellule coinvolte, quali per esempio cellule endoteliali nella genesi di emangiomi o emangiosarcomi, è possibile ma molto rara) (Marcato, 2002). Nella cagna è frequente la proliferazione contemporanea di più di un tipo cellulare, perciò si definiscono "semplici" quelle forme (adenomatose o carcinomatose) caratterizzate dalla proliferazione di un solo elemento cellulare, rappresentato nella maggior parte dei casi da epitelio (c.d. adenomi e carcinomi semplici) e più raramente da mioepitelio (c.d. mioepiteliomi benigni e maligni). Si definiscono invece "complessi" i casi in cui accanto ad una proliferazione epiteliale (benigna o maligna) è presente anche una proliferazione mioepiteliale (adenomi e carcinomi complessi). Nelle forme c.d. "complesse", il mioepitelio che prolifera presenta spesso anche una metaplasia cartilaginea o ossea e in tali casi si parla di tumore misto (Marcato, 2002). La patologia neoplastica della mammella della cagna risulta quindi un sistema molto complesso dal punto di vista patogenetico, essendo presenti frequenti aspetti di

crescita tumorale di tipo epiteliale o talvolta a aree con differenziazione metaplastica in senso cartilagineo ed osseo. Ora, il problema che ci si pone di fronte a tali tipologie tumorali, risiede nella determinazione della linea cellulare all'origine di tali fenomeni di differenziazione in tessuti a pattern mesenchimale nel contesto di una neoplasia epiteliale, e per questo sono state proposte 3 ipotesi (Lien *et al.*, 2004):

1. "collision theory": due tumori indipendenti sono localizzati uno adiacente all'altro. Tali neoplasie sono biclonali e questo rappresenta un modello esplicativo per i tumori mammari bifasici.
2. "combination theory": tumori monoclonali originati da cellule staminali/cellule progenitrici multipotenti. Modello esplicativo per la genesi dei tumori monofasici e bifasici.
3. "conversion o metaplastic theory": le cellule mioepiteliali/basali cambiano il loro fenotipo tramite metaplasia o transdifferenziazione. Questi tumori sono monoclonali. Un modello esplicativo per la genesi di tumori mammari monofasici e bifasici.

La più frequente indicazione considera la metaplasia delle cellule fusiformi di probabile origine mioepiteliale, ma non esiste ancora una prova definitiva. L'epitelio mammario è costituito, come detto, da due tipologie di cellule strettamente associate: luminali e abluminali, le prime (secretorie) mostrano positività immunoistochimica per le citocheratine (CK) 8, 9, 18, 19 mentre le ultime (mioepiteliali), esprimono le CK 5, 6, 14 e 17. In medicina veterinaria esistono indicazioni sull'uso di anticorpi anti-vimentina, anti-actina del muscolo liscio e anti-proteina S-100 per poter individuare le cellule mioepiteliali ma la loro utilità nella diagnosi differenziale da altre proliferazioni mesenchimali (fibroblastiche o miofibroblastiche) è tuttavia opinabile. In un nostro studio precedente è stato indagato il fenotipo complesso e misto di 77 tumori mammari della cagna (41 carcinomi semplici e 9 complessi, e 27 carcinomi in tumore misto), per i quali erano disponibili risultati ottenuti da altri studi su indagini immunoistochimiche per la CK 14, 5/6, vimentina e alpha actina del muscolo liscio (SMA). In tutti i casi la colorazione delle cellule basali abluminali

(mioepiteliali) era risultata positiva per la CK 5/6 e 14, e si apprezzava come continua nei carcinomi semplici non-infiltranti, mentre era discontinua nei carcinomi infiltranti. Le cellule di forma da allungata a stellata, che proliferavano nei pattern complessi o le forme metaplastiche ossee/cartilaginee dei pattern misti non sono risultate colorate dalla CK 5/6 e la loro positività era da scarsa/incostante a negativa per la CK 14. Per quello che riguarda la SMA, la positività era simile alla CK 14, ovvero più intensa nei tumori complessi, mentre negativa nei pattern misti. Gli anticorpi anti-vimentina hanno prodotto un forte segnale nelle cellule mioepiteliali localizzate nello strato basale dei carcinomi semplici. La medesima forte colorazione era evidente sia nei pattern complessi che misti, cosiccome nelle cellule stromali e vascolari. Un sigolo strato di cellule mioepiteliale è evidente nei carcinomi semplici della ghiandola mammaria della cagna e la sua organizzazione in in maniera continua o discontinua permette la oggettiva discriminazione tra tumori non-infiltranti e tumori localmente infiltranti, fenomeno osservato anche in medicina umana. Tra i marker utilizzati per l'identificazione del mioepitelio (CK 5/6, 14 e SMA), è stata osservata un'espressione da scarsa (CK 14) a moderata (SMA) nei nidi di cellule tipici della tipologia complessa, mentre l'espressione della SMA era negativa nelle aree metaplastiche (cartilaginee/ossee) dei tumori misti. Questi risultati potrebbero essere spiegati accettando l'ipotesi di una modificazione (metaplasia) delle cellule basali abluminali (mioepiteliali) all'origine dei pattern complessi e misti, oppure la genesi di queste due tipologie di tumore mammario da altre cellule mesenchimali (miofibroblasti o fibroblasti stromali). La forte positività alla vimentina evidenziata sia nel pattern complesso, sia in quello misto, cosiccome nelle cellule localizzate nello strato basale (mioepiteliale), nei fibroblasti stromali e nelle cellule dei vasi, indica una scarsa utilità di questo marker per l'identificazione dell'origine da una singola tipologia cellulare, in particolare la cellula mioepiteliale, dei pattern complessi e misti (Sassi *et al.*, 2007).

La questione sull'origine dei tumori mammari complessi e misti, potrebbe essere risolta ricorrendo alla classificazione su base molecolare.

Il carcinoma metaplastico del seno, in medicina umana, secondo la più recente classificazione del WHO, include il carcinoma squamocellulare, l'adenocarcinoma a cellule fusate, il carcinoma adenosquamoso, il carcinoma con metaplasia condroide e/o ossea ed il carcinosarcoma (Ellis *et al.*, 2003).

Weigelt *et al.* (2008), selezionarono 11 sottotipi istologici speciali di tumore al seno, tra cui il carcinoma metaplastico, per indagare se tali tipologie costituissero delle distinte entità a livello molecolare. Per fare ciò analizzarono i loro pattern di espressione proteica tramite colorazione immunohistochimica su microarray tessutali, con un pannello di 22 anticorpi rivolti verso marker specifici della tipologia cellulare e della differenziazione. In sintesi, la colorazione immunohistochimica ha rivelato che numerosi tipi istologici speciali possedevano simili pattern di espressione proteica in grado di suggerire un comune background eziologico e/o il coinvolgimento di comuni genetici/epigenetici meccanismi di sviluppo tumorale (Weigert *et al.*, 2008). Tali risultati forniscono una rivalutazione della classificazione istologica del tumore al seno esistente, e suggeriscono che il pannello di 11 sottotipi di tumore al seno selezionato seguendo i criteri del WHO, può essere ridotto basandosi sui profili molecolari dei tumori (Weigert *et al.*, 2008).

Basandosi su uno studio preliminare condotto da Fulford *et al.* (2004) volto a caratterizzare le caratteristiche morfologiche dei carcinomi basal-like, Reis-Filho *et al.* (2006) osservarono che le aree di metaplasia, a differenziazione squamosa/fusata, in carcinomi duttali infiltranti a stadio III, erano predittori indipendenti del fenotipo basal-like. Applicarono così il pannello di anticorpi proposto da Nielsen *et al.* (2004) a 65 carcinomi metaplastici del seno, ottenendo come risultato che 59 su 65 di essi (90.8%) mostravano il tipico immunofenotipo dei carcinomi al seno basal-like (TABELLA 4).

TIPO ISTOLOGICO	n	ERB-B2	luminal	basal-like	non determinato
carcinoma a cellule fusate	21	0	1	19	1
carcinoma con metaplasia squamosa	19	1	1	17	0
carcinoma produttore matrice	8	0	0	16	2
carcinoma con elementi eterologhi	7	0	0	7	0

TABELLA 4. Classificazione di 65 carcinomi metaplastici al seno secondo il pannello immunohistochimico proposto da Nielsen *et al.* (2004) (da Reis-Filho *et al.*, 2006; mod).

Nello stesso anno, Kim *et al.* (2006), per verificare la prevalenza e le caratteristiche di ogni sottotipo molecolare di tumore al seno in Korea, allestirono dei microarray di tessuto da 776 carcinomi al seno rimossi chirurgicamente ed eseguirono colorazioni immunohistochimiche utilizzando gli anticorpi conosciuti per l'epitelio luminale e basale. Sulla base dei risultati ottenuti, oltre a suddividere i casi nei 5 sottotipi, osservarono che istologicamente, la maggior parte dei carcinomi metaplastici (75%) appartenevano al tipo basal like e mostravano una forte immunopositività per i marcatori delle cellule basali.

Recentemente Kuroda *et al.* (2008) hanno aggiunto ulteriori conferme all'ipotesi di Kim *et al.* (2006) e Reis-Filho *et al.* (2006) che la maggior parte dei carcinomi metaplastici siano tumori basal-like, riportando due casi di carcinoma basal-like mostranti caratteristiche istologiche di carcinoma metaplastico.

Queste scoperte enfatizzano ulteriormente i possibili vantaggi di una classificazione molecolare applicata al tumore mammario della cagna. Infatti se si confermasse l'appartenenza al fenotipo basal-like anche da parte dei tumori metaplastici della

cagna, si potrebbe porre fine alle perplessità patogenetiche ed alle questioni tassonomiche sollevate dalla classificazione dei tumori misti. Inoltre, il coinvolgimento dello strato basale dell'epitelio mammario, e quindi del mioepitelio, nello sviluppo di neoplasie basal-like assimilabili a tumori con fenomeni di metaplasia ossea/cartilaginea, renderebbe l'ipotesi "metaplastic theory" la più credibile.

Il metodo classificativo della medicina umana è stato applicato anche ad una rara (5% circa di tutti i casi di tumore al seno) ma spesso letale forma di tumore al seno localmente invasivo, il carcinoma infiammatorio (Bertucci *et al.*, 2005). Il carcinoma infiammatorio del seno, mostra infatti differenze con il carcinoma non infiammatorio dal punto di vista epidemiologico, isto-clinico e prognostico (Bertucci *et al.*, 2005). Alcune regioni geografiche presentano una maggiore incidenza di carcinoma infiammatorio e oltre al fatto che la sua incidenza è aumentata maggiormente rispetto al carcinoma non infiammatorio (Chang *et al.*, 1998). Tale neoplasia si dimostra frequentemente di alto grado, non presenta positività ai recettori ormonali, è dotata di spiccata neoangiogenesi e tendenza all'invasione locale (Jaiyesimi *et al.*, 1992), possiede un comportamento clinico aggressivo con una elevata frequenza di coinvolgimento del linfonodo ascellare e al momento della diagnosi, nel 35% circa dei casi, metastasi distanti. Nonostante le scoperte nel campo dei trattamenti terapeutici multidisciplinari, la prognosi risulta molto meno favorevole rispetto al carcinoma non infiammatorio, con un tasso di sopravvivenza dopo 5 anni che varia dal 30% al 50% (Jaiyesimi *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1998). Bertucci *et al.* (2005) hanno monitorato l'espressione degli RNA di circa 8000 geni in 81 campioni di tumore al seno, 37 dei quali erano carcinomi infiammatori. Il clustering gerarchico identificò i 5 sottotipi molecolari sia nel gruppo dei carcinomi non infiammatori, sia in quello degli infiammatori, e che, soprattutto, tali entità erano notevolmente simili a quelle definite in precedenti studi, con le stesse caratteristiche isto-cliniche. Le loro scoperte rinforzarono la fiducia nella tassonomia basata sull'espressione molecolare e

diedero prova della sua universalità nel campo del tumore al seno, indipendentemente dalla specifica forma clinica.

La riproducibilità sul carcinoma infiammatorio al seno della metodica classificativa dimostrata da Bertucci *et al.* (2005), invita a riflettere se anche nel carcinoma infiammatorio mammario della cagna si possano ottenere simili risultati.

Attualmente vengono riportate solo la donna e la cagna come specie in cui può insorgere spontaneamente il carcinoma infiammatorio della ghiandola mammaria (Peña *et al.*, 2003). Clinicamente il carcinoma infiammatorio al seno della donna e quello mammario della cagna presentano una rapida insorgenza di sintomi che rimandano ad un processo infiammatorio (eritema, gonfiore e calore della cute al di sopra della mammella) spesso senza evidenza di una massa sottostante (Pérez-Alenza *et al.*, 2004). Per questo motivo, tale neoplasia viene spesso erroneamente diagnosticata come una dermatite o mastite (Tavassoli, 1999; Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001). La diagnosi di carcinoma infiammatorio viene eseguita clinicamente, confermata in seguito dalle tipiche lesioni istologiche come l'invasione di emboli neoplastici a livello di vasi linfatici del derma. Questo è l'unico criterio istologico per la diagnosi, poichè sono stati descritti numerosi istotipi alla base della patologia (Tavassoli, 1999; Peña *et al.*, 2003; Elis e Teitelbaum, 1974). In molti casi la diagnosi clinica e patologica coincidono, ma in alcuni pazienti può essere presente una sola delle due evenienze (Kleer *et al.*, 2000; Bonnier *et al.*, 1995). La presenza di coinvolgimento dei vasi linfatici (embolizzazione) in assenza dei caratteristici segni clinici del carcinoma infiammatorio prende il nome di carcinoma infiammatorio occulto e tale evenienza frequentemente precede la sua presentazione clinica (Saltzstein, 1974; Amparo *et al.*, 2000). Sono stati descritti due tipologie cliniche di carcinoma infiammatorio della donna (Giordano e Hortobagyi, 2003; Bonnier *et al.*, 1995; Amparo *et al.*, 2000) e della cagna (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Attia-Sobol *et al.*, 1993): primario, senza un precedente tumore mammario; secondario, in seguito ad escissione chirurgica di un tumore mammario maligno. Fortunatamente questa

tipologia di tumore altamente aggressivo è poco comune sia nell'uomo (Chang *et al.*, 1998), sia nel cane (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

L'importanza del carcinoma infiammatorio del cane risiede nel fatto che tale specie viene proposta come modello naturale nel quale studiare la patologia, considerando che il carcinoma infiammatorio si verifica spontaneamente unicamente nella donna e nel cane (Peña *et al.*, 2003).

Se la classificazione su base molecolare applicata al carcinoma infiammatorio al seno della donna si rivelasse utile e praticabile anche nella controparte canina, si potrebbero apportare nuovi stimoli nello studio di questa particolare forma di tumore mammario.

Altro vantaggio risiede nelle implicazioni terapeutiche della fenotipizzazione dei tumori al seno, che risulta essere comunque ancora motivo di indagini e conferme in patologia umana, ma che alla luce di una possibile analogia con i tumori mammari della cagna troverebbero riscontri positivi anche in medicina veterinaria per l'elaborazione di specifiche terapie farmacologiche alternative alle procedure chirurgiche.

4- CONTRIBUTO SPERIMENTALE

4.1- MATERIALI E METODI

4.1.1- CASI E RACCOLTA DATI DI FOLLOW-UP

Sono stati raccolti 45 campioni di tessuto proveniente da cani femmine con tumori mammari primitivi. Tutti i cani sono stati sottoposti ad intervento chirurgico presso il Dipartimento Clinico e Chirurgico della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna e presso cliniche private. I campioni di tessuto prelevati sono stati immediatamente fissati in formalina tamponata al 10% e processati con procedure di routine. Prima dell'intervento chirurgico ed ogni 2 mesi, per un periodo di 2 anni, sono stati eseguiti controlli radiografici a livello toracico ed ultrasuonogrammi della milza e del rene. Nessuno dei cani presentava metastasi a distanza al momento di sottoporsi alle procedure chirurgiche (M0). Durante questo periodo sono stati raccolti ed indicati come tempo di sopravvivenza i dati di follow-up. Per tempo di sopravvivenza s'intende il periodo intercorso tra l'intervento chirurgico e la morte determinata dalla neoplasia, sia in maniera spontanea, sia per eutanasia. Dopo 24 mesi di follow-up, gli animali che si presentavano ancora vivi sono stati considerati idonei, al contrario di quelli che invece erano deceduti.

4.1.2- GRADO DEL TUMORE ED INVASIVITA'

Le diagnosi istologiche sono state ottenute su sezioni colorate con ematossilina ed eosina secondo Misdorp *et al.* (1999), ed il grado del tumore secondo Lagadic e Estrada (1990). L'invasività è stata determinata seguendo un sistema precedentemente proposto da Gilbertson *et al.* (1983), secondo il quale, viene indicato stadio 0 per tumori senza invasione stromale (*in situ*), stadio I, tumori con invasione stromale e stadio II per tumori con emboli neoplastici vasali.

4.1.3- IMMUNOISTOCHEMICA

Per ogni tumore sono state ottenute 5 sezioni consecutive di 4 micronm di spessore utilizzate per anticorpi anti -recettore degli estrogeni (ER), -recettore del progesterone (PR), -ERB-B2, -citocheratina 5/6 (CK5/6), e -citocheratina 14 (14). Le sezioni sono state sparaffinate in toluene e reidratate. Le perossidasi endogene sono state bloccate tramite immersione in perossido di idrogeno allo 0,3% per 20 minuti. Quindi dopo averle sciacquate in tampone Tris si è proceduti allo smascheramento degli antigeni tramite tampone citrato (2.1 grammi di acido citrico monoidrato per litro di acqua distillata), a pH 6.0 e scaldate in forno a microonde alla potenza di 750 W per due cicli di 5 minuti cadauno. In seguito sono state raffreddate a temperatura ambiente per 20 minuti.

Gli anticorpi primari utilizzati sono riassunti in TABELLA 4. Tutti gli anticorpi sono stati incubati con il tessuto a -4°C per una notte, eccetto per l'anticorpo anti-PR, il cui periodo di incubazione è stato di 1.5 ore alla temperatura di 37°C. A questo punto è stato applicato sulle sezioni un kit commerciale di streptoavidina-biotina-perossidasi (LSAB Kit, Dako, Amsterdam, The Netherlands). Il cromogeno utilizzato è stato la Diaminobenzidina (0.05% per 10 minuti a temperatura ambiente) e come colorante di contrasto si è applicata l'Ematossilina di Papanicolaou.

I controlli negativi sono stati ottenuti sostituendo l'anticorpo primario con un anticorpo monoclonale dello stesso isotipo non specifico. Come controllo positivo, per verificare la cross-reattività con i tessuti del cane e la specificità della colorazione immunoistochimica, sono state utilizzate sezioni di normale ghiandola mammaria di cane (per gli anticorpi anti-ER, -PR e -CK14), cute di cane (anticorpo anti-CK5/6) e pancreas bovino (anticorpo anti-ERB-B2), seguendo gli stessi protocolli.

4.1.4- INTERPRETAZIONE DELLA COLORAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA

La classificazione dei risultati della colorazione è stata eseguita semiquantitativamente. Tutti I markers immunoistochimici sono stati suddivisi in gruppi positivi e gruppi negativi. In particolare, i casi negativi erano considerati quelli che non mostravano colorazione o la colorazione risultava minore di una certa percentuale di cellule tumorali positive. Per positivi, si sono considerati quelli con colorazione inequivocabile in almeno una definita percentuale di cellule tumorali. La positività per la CK5/6 e la CK14, secondo Kim *et al.* (2006), è stata definita come il rilevamento di almeno 1% di cellule tumorali invasive che mostravano una forte positività citoplasmatica. L'immunocolorazione per l'ERB-B2 è stata interpretata come positiva quando almeno il 10% delle cellule tumorali mostrava da moderata a forte colorazione di membrana completa (Millanta *et al.*, 2005b). I casi sono stati considerati positivi per l'ER ed il PR quando si osservava una positività nucleare in almeno il 5% delle cellule tumorali (Millanta *et al.*, 2005a).

4.1.5- CLASSIFICAZIONE IN SOTTOTIPI MOLECOLARI

Secondo Yang *et al.* (2007), i sottotipi tumorali sono stati definiti come luminal-like A (ER+ e/o PR+, ERB-B2 -, qualsiasi CK5/6 o CK14), luminal-like B (ER+ e/o PR+, ERB-B2+, qualsiasi CK5/6 o CK14), ERB-B2-esprimenti (ER-, PR-, ERB-B2+, qualsiasi CK5/6 o CK14), basal-like (ER- e/o PR-, ERB-B2-, CK5/6+ e/o CK14+), e non classificati o normal-like (negativi per tutti i markers).

4.1.6- ANALISI STATISTICA

Per correlare i sottotipi molecolari è stato usato il metodo di Pearson, testato per la significatività usando il χ^2 con un gran numero di casi omogenei per l'invasione (0, I, II), il grado (1, 2, 3) ed il gruppo istologico; quest'ultimo come segue: 1) semplice: comprendente tutti i carcinomi semplici; 2) complesso/misto: in cui erano inclusi tutti i carcinomi complessi e i carcinomi in tumore misto; 3) altri: in cui erano presenti gli altri tipi istologici considerati dal sistema classificativo di Misdorp *et al.* (1999).

Sono state analizzate le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier per testare l'influenza di una classificazione in sottotipi su base molecolare sulla prognosi e compararle con le analisi di sopravvivenza. Le variabili (sottotipi su base molecolare, stadiazione, grado ed istotipo) sono state inoltre esaminate con analisi multivariabili. Le analisi sono state eseguite utilizzando software CSS (Statsoft, Tulsa, OK), ed è stato stabilito un livello convenzionale di 5% per definire la significatività statistica.

ANTICORPO (ANTI-)	CLONE	PRODUTTORE	DILUIZIONE UTILIZZATA
Recettore Estrogeno		Zymed (South San Francisco, Ca)	1:50
Recettore Progesterone	PR 4-12	EMD Biosciences (San Diego, Ca)	1:10
ERB-B2		Dako (Glostrup, Denmark)	1:50
Citocheratina 14	Ab-1 (LL002)	NeoMarkers (Fremont, Ca)	1:300
Citocheratina 5/6	D5/16B4	Zymed (South San Francisco, Ca)	1:100

TABELLA 4. Anticorpi primari utilizzati nel presente studio.

4.2- RISULTATI

I 45 cani femmina avevano un range di età dai 4 ai 15 anni (media \pm deviazione standard = 9.66 ± 2.36 ; mediana= 10). Sedici erano meticci e 28 di razza, in particolare 6 pastori tedeschi, 5 Yorkshire terrier, 2 pointer, 2 bassotti, 2 barboncini. Per un rimanente caso non si conosceva né età né razza.

Le diagnosi istologiche comprendevano 7 carcinomi *in situ*, 17 carcinomi semplici (11 tubulo-papillari e 6 solidi), 20 carcinomi complessi/misti (16 tubulo-papillari complessi e 4 carcinomi in tumore misto) e un carcinoma squamoso (incluso nel gruppo degli “altri”). La stadi azione ha incluso 7 tumori non-infiltranti (carcinomi *in situ*, stadio 0 i.e. gli stessi identificati tramite sistema di classificazione morfologica), 24 carcinomi con invasione stromale (stadio I) e 14 carcinomi con emboli vasali e/o coinvolgimento dei linfonodi regionali (stadio II). La determinazione del grado ha rivelato 18 tumori di grado 1 (18 senza e 2 con invasione vasale), 14 di grado 2 (11 senza e 3 con invasione vasale) e 13 di grado 3 (4 senza e 9 con invasione vasale). Dopo 24 mesi dalla mastectomia, 33 su 45 casi erano ancora vivi e 12 casi erano deceduti, o a seguito di eutanasia o spontaneamente, e in entrambi i casi la morte è stata determinata dallo sviluppo tumorale.

Seguendo i criteri stabiliti, 35 casi erano ER e/o PR positivi, mentre 10 erano negativi; 22 casi sono stati classificati positivi all'ERB-B2 e 10 positivi per l'espressione delle citocheratine basali.

Secondo i criteri adottati per la classificazione in sottotipi molecolari, i casi luminal B (n=22 casi) comprendevano il 49% dei tumori, seguiti dai luminal A (n=13, 29%), e dai basal-like (n=10, 22%). Nessun caso è risultato esprimente l'ERB-B2. Nessun caso è risultato non classificabile.

Nessuna differenza significativa era presente nelle percentuali dei sottotipi molecolari tra i 3 gruppi di invasività (Pearson Chi-square $P=0.76$), la loro distribuzione è indicata in Tabella 5.

Una maggiore percentuale di casi luminal A e basal è stata registrata tra i carcinomi di grado 1 (luminal A 50%, luminal B 12%, basal 38%); una maggiore percentuale di casi luminal B erano carcinomi di grado 2 (luminal A 14%, luminal B 63%, basal 23%) e di grado 3 (luminal A 15%, luminal B 77%, basal 8%) (Pearson Chi-square $P=0.009$).

Nessuna differenza significativa è stata individuata nelle percentuali dei sottotipi molecolari tra carcinomi semplici e complessi/misti (Pearson Chi-square $P=0.47$); il gruppo indicato come “altri” non è stato analizzato stante la poca numerosità dei casi (un carcinoma squamoso).

Le curve di Kaplan-Meier stimate dei 3 sottotipi (luminal-like A, luminal-like B e basal-like) non hanno evidenziato differenze significative nell'analisi di sopravvivenza ($P=0.85$), ma sorprendentemente, si è osservato che le neoplasie basal-like mostravano un miglior andamento rispetto ai gruppi luminal (FIGURA 5). Il gruppo dei luminal B aveva un andamento leggermente peggiore rispetto ai casi luminal A. Sia l'invasività ($P=0.0025$) che lo stadio, quest'ultimo analizzato separatamente per tumori con ($P=0.047$) e senza ($P=0.03$) invasione vasale, erano significativamente associati con la prognosi.

La stadiazione e il grado hanno dimostrato di essere variabili prognostiche indipendenti in una analisi multiparametrica (TABELLA 6), al contrario della classificazione in sottotipi molecolari, che si è rivelata una variabile dipendente.

Gruppo	No.	Non -infiltranti	Invasione Stromale	Invasione Vascolare
Luminal-like A	13	1	8	4
Luminal-like B	22	4	10	8
Basal-like	10	0	8	2

TABELLA 5. Suddivisione dei 45 casi esaminati secondo il sottotipo molecolare e lo stadio.

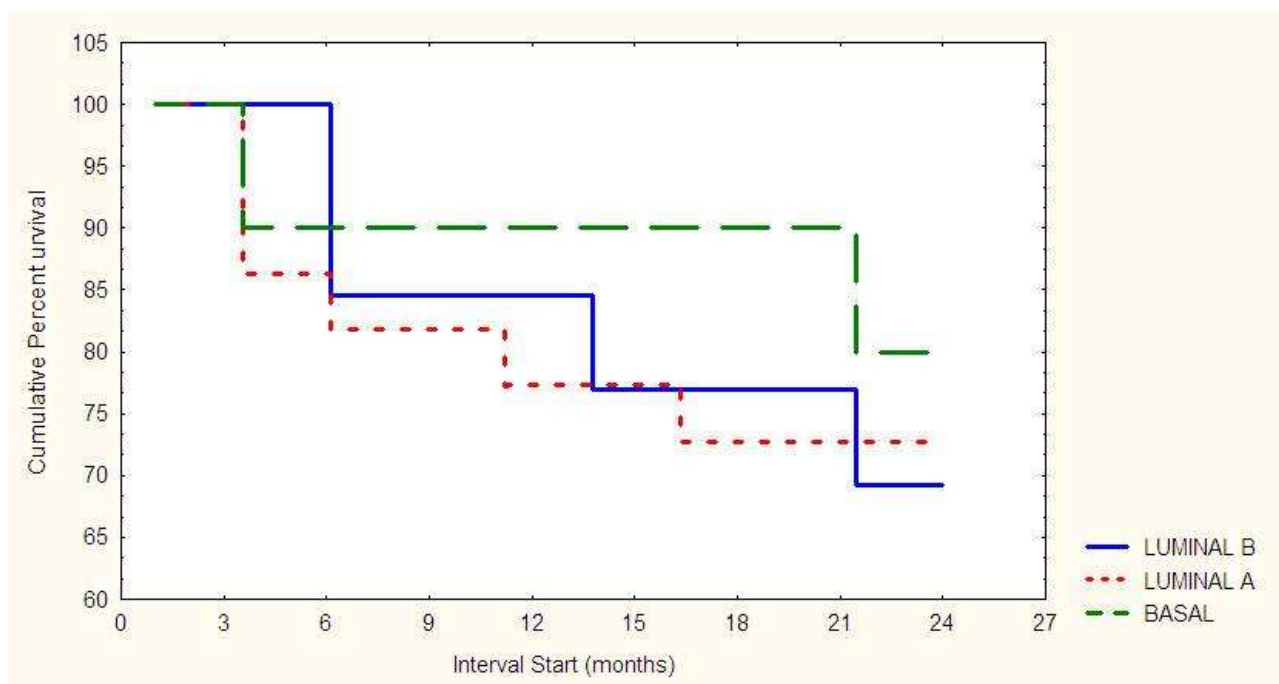


FIGURA 5. Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier dei differenti sottotipi molecolari.

	beta	errore standard	t-value	exponent beta
Stadio	1.32	0.65	2.03	3.76
Grado	1.25	0.49	2.54	3.50
Tipo istologico	-0.72	0.64	- 1.11	0.48
Gruppo molecolare	-0.31	0.57	- 1.05	0.73

TABELLA 6. Analisi multiparametrica. Proportional hazard Cox regression $\text{Chi}^2 = 20.20$ - $\text{df} = 4$ - $P = 0.00046$.

5- DISCUSSIONE

Il tumore al seno della donna è considerato una patologia eterogenea per quello che riguarda i recettori per l'estrogeno, il grado tumorale e l'età (Contesso *et al.*, 1987).

Alcuni studi, volti ad esaminare il pattern di espressione dei geni utilizzando lo hierarchical clustering, hanno evidenziato quattro principali clusters e hanno permesso di classificare il tumore al seno in quattro gruppi: luminal-like (successivamente diviso in tipo A e B), basal-like, ERB-B2-positivi e normal-like (Perou *et al.*, 2000; Sørli *et al.*, 2003).

Basandosi su questo innovativo sistema di classificazione, il principale obiettivo nell'applicare tale metodo, risulta essere la possibilità di dimostrare un suo ruolo ed il suo valore per quello che concerne la prognosi. Inoltre, questa classificazione su base molecolare del tumore al seno fornisce l'opportunità di indagare interrogativi biologici in entità omogenee, e di arricchire uno specifico sottotipo con un segnale rilevante. Questo approccio potrebbe dimostrarsi migliore, rispetto a studi in cui esiste una popolazione "diluata", dove pazienti con generico tumore al seno vengono inclusi senza una precisa distinzione (Andrè *et al.*, 2007).

Tuttavia, una classificazione su base molecolare secondo profili di espressione genica risulta poco pratica in laboratori forniti di metodiche diagnostiche di routine, oltre a delineare un quadro poco preciso dei reali sottotipi (Andrè *et al.*, 2007). Uno dei motivi risiede nel fatto che i valori di mRNA non sempre corrispondono a modifiche nell'espressione proteica (Kim *et al.*, 2006). Altro fattore da considerare è quello che la qualità delle proteine non dipende solo dalla quantità e dal grado di trascrizione e traslazione, ma anche dalla degradazione e dal grado di trasporto da parte delle cellule. Quindi, una metodica immunohistochimica potrebbe rivelarsi utile nell'identificare lo status dell'espressione cellulare e la specifica localizzazione della proteina (Kim *et al.*, 2006). Perciò, per meglio definire queste sottoclassi, sono stati proposti alcuni markers immunohistochimici utili nell'identificazione delle categorie molecolari (Kim *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Conforti *et al.*, 2007; Cheang *et al.*, 2008).

In medicina veterinaria, i tumori della ghiandola mammaria vengono classificati su base morfologica, fornendo delle buone indicazioni prognostiche (Misdorp, 1976; Parodi, 1983) che sono rese ancor più complete da ulteriori strumenti di prognosi come lo stadio (Gilbertson *et al.*, 1983), il grado istologico (Lagadic e Estrada, 1990), gli indici di proliferazione cellulare (Peña *et al.*, 1998; Sarli *et al.*, 2002), lo status dei recettori ormonali (Millanta *et al.*, 2005; Gama *et al.*, 2008b), l'espressione di molecole di adesione (Brunetti *et al.*, 2005; Gama *et al.*, 2008a). Tuttavia, le neoplasie mammarie maligne del cane rappresentano un gruppo eterogeneo di tumori con differente assetto molecolare, per cui una classificazione che prenda in considerazione tali differenze molecolari, porterebbe indiscutibili vantaggi.

In questo studio, l'applicazione di un pannello di anticorpi comunemente utilizzati per caratterizzare gruppi molecolari in patologia umana, ha permesso di identificare 3 gruppi (luminal-like A e B e basal-like) dei 5 conosciuti (nessun caso ERB-B2 e normal-like era presente tra i nostri).

Gama *et al.* (2008a) hanno identificato 4 gruppi (luminal-like A e B, basal-like e ERB-B2 positivi) in una serie di 102 carcinomi mammari della cagna. Le indagini in medicina veterinaria sembrano confermare l'importanza della caratterizzazione molecolare dei tumori anche nelle neoplasie mammarie del cane, ma ulteriori approfondimenti si rendono necessari per confermare i risultati attualmente ottenuti unicamente dal presente studio e da quello di Gama *et al.* (2008a).

In questa ricerca, la classificazione su base molecolare dei tumori mammari della cagna si è rivelata legata al grado, ma non all'invasione e alla classificazione morfologica. Il gruppo dei luminal-like A comprende una significativa ed elevata percentuale di tumori di grado I rispetto al gruppo dei luminal-like B, nel quale prevalgono neoplasie di grado 2 e 3. Nello studio di Gama *et al.* (2008a), solamente il gruppo basal-like era associato al grado ed alla presenza di invasione vascolare.

Da numerose indagini è risultata una associazione tra divisione in gruppi su base molecolare del cancro al seno della donna e grado istologico (Yang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; Conforti *et al.*, 2007). Pattern semplici o complessi/misti non sembrano

essere correlati con uno specifico gruppo molecolare nei nostri risultati; ciò è in contrasto con Gama *et al.* (2008a), i quali avevano riscontrato che la tipologia dei tumori complessi era associata con neoplasie luminal-like A, il pattern semplice ed il carcinosarcoma ai gruppi ERB-B2 positivi e basal-like.

Tramite l'applicazione di questo sistema classificativo in medicina umana sono disponibili risultati contrastanti sulla relazione tra differenti variabili clinico-patologiche e la sopravvivenza, dove solamente gli ERB-B2 positivi (Kim *et al.*, 2006) o i basal-like (Sørli *et al.*, 2001) hanno mostrato evidenze di associazioni significative con una breve sopravvivenza. Nel presente studio non è stata ottenuta un'associazione tra il sistema di classificazione su base molecolare e la sopravvivenza, mentre Gama *et al.* (2008a) hanno riscontrato che solo il gruppo dei basal-like era significativamente associato con una scarsa sopravvivenza. La differenza tra questi studi può essere giustificata dai diversi pannelli di anticorpi e criteri utilizzati per definire la positività ai marcatori basali (citocheratina 5/6 e 14 nel nostro studio, citocheratina 5, p63 e P-caderina in quello di Gama *et al.* (2008a)).

Sulla base dei nostri risultati, l'analisi multiparametrica ha dimostrato che un sistema di classificazione su base molecolare è risultato essere un valore dipendente, se paragonato all'invasività e al grado, che possiedono invece un ruolo indipendente. Questi dati suggeriscono che, attualmente, si dovrebbe procedere con cautela nell'applicare tale sistema classificativo al cane, specie nella quale le più utili informazioni sulla prognosi sono ottenute dall'invasività e dal grado. Tuttavia, dal momento che il cane viene considerato un modello spontaneo del tumore al seno della donna, tipologie simili di neoplasie dovrebbero essere comparate tra le due specie.

Poiché la base morfologica non garantisce il raggruppamento di tumori biologicamente omogenei, l'applicazione di un sistema basato su differenze a livello molecolare permetterebbe di comparare al meglio gruppi omogenei. Da questo studio e da quello di Gama *et al.* (2008a), si è ora dimostrata l'esistenza di gruppi suddivisi

a seconda delle loro caratteristiche molecolari, ma le analogie tra i gruppi della donna e quelli della cagna devono essere confermate da ulteriori indagini.

L'applicazione di questo sistema di classificazione fornisce informazioni aggiuntive sulla diversa origine cellulare dei tumori basal-like e luminal-like. Perou *et al.* (2000) hanno evidenziato che i tumori basal-like condividono alcune caratteristiche molecolari con le cellule mioepiteliali, che costituiscono la porzione basale del normale epitelio, mentre i tumori luminal-like possiedono caratteristiche molecolari in comune con le normali cellule luminali. Alcuni anni dopo Reis-Filho *et al.* (2006) hanno osservato che un'elevata percentuale di carcinomi metaplastici al seno possedeva immunofenotipo dei carcinomi basal-like. In medicina veterinaria è ancora motivo di dibattito l'origine delle componenti mesenchimali nei cosiddetti pattern complessi e misti dei tumori mammari, per i quali la cellula mioepiteliale rappresenta la più probabile origine (Hellmén, 2005). Nei nostri casi il gruppo dei basal-like condivide alcune caratteristiche con i tumori luminal-like A (un'elevata percentuale di neoplasie di grado I), evenienza non conosciuta nei casi di medicina umana ed in contrasto con i risultati di Gama *et al.* (2008a). Tale discrepanza potrebbe trovare due possibili spiegazioni:

- il pannello di anticorpi e i criteri per identificare la positività dei marcatori basali adottati da Gama *et al.* (2008a) sono differenti dai nostri;
- alcuni dei nostri casi risultati basal-like potrebbero derivare da casi luminal-like che hanno reagito negativamente per l'ER e il PR, ma possiedono cellule mioepiteliali che, nei tumori mammari del cane, vengono frequentemente espressi nei pattern complesso e misto.

A riguardo del primo punto, è risaputo che la caratterizzazione del gruppo basal-like è la più difficile rispetto a quella degli ERB-B2-positivi e dei luminal-like; per questo motivo sono stati proposti numerosi e differenti pannelli e metodi (Laasko *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006).

Per quello che concerne la seconda ipotesi, il criterio che abbiamo adottato (almeno 1% di cellule positive ai marcatori basali nella componente invasiva) è stato scelto

proprio per evitare possibile confusione con la frequente presenza di proliferazioni mioepiteliali nei tumori mamamri della cagna. E' risaputo che la citocheratina 5 è dotata di una sensibilità più elevata come marcatore basale rispetto alla citocheratina 14, poiché può essere espressa sia da cellule progenitrici bipotenti, sia da cellule basal-like, mentre l'espressione della citocheratina 14 è limitata a cellule mioepiteliali (basali) mature (Kim *et al.*, 2006; Laasko *et al.*, 2006).

Per caratterizzare al meglio il gruppo dei basal-like e per evitare confusione con casi che appartengono ad altri gruppi, l'applicazione del pannello di anticorpi costituito da numerosi marcatori basali si rende necessario nei carcinomi mammari della cagna.

6- CONCLUSIONE

In questi ultimi anni, lo studio del tumore al seno della donna e la sua classificazione si sono rivolti con sempre maggior decisione nei confronti della ricerca di possibili implicazioni pratiche, sia dal punto di vista tassonomico, che, soprattutto, da quello prognostico/terapeutico. I risultati finora raggiunti sono incoraggianti, e la suddivisione della neoplasia in sottotipi molecolari sembra la strada giusta nel campo della prevenzione e lotta al tumore al seno. La ricerca di un modello animale per il cancro al seno della donna è da sempre uno degli stimoli che spinge la medicina veterinaria oncologica nell'applicare le entusiasmanti scoperte della medicina umana nel proprio campo.

In questo studio, l'applicazione di un pannello di anticorpi comunemente utilizzato in patologia umana per la caratterizzazione dei gruppi molecolari, ha permesso di identificare 3 gruppi (luminal-like A e B e basal-like) sui 5 conosciuti (nessun ERB-B2 positivo o normal-like è presente nei nostri campioni). Queste scoperte rafforzano l'ipotesi che i tumori mammari della cagna sono un modello per il tumore al seno della donna, ma per rendere questa comparazione più credibile, dovrebbero essere identificati e paragonati dei gruppi omogenei. Le neoplasie mammarie maligne del cane si dimostrano essere un gruppo eterogeneo di tumori con differenti espressioni molecolari, per questo potrebbero trarre vantaggio da una classificazione che tenga in considerazione tali differenze molecolari, come avviene in medicina umana. Tuttavia, l'esistenza nel cane di tutti i gruppi proposti per il tumore al seno della donna ed il loro diverso comportamento biologico deve essere ancora confermato. Dai nostri dati la classificazione su base molecolare del tumore mammario della cagna è associato al grado, ma non all'invasività e alla classificazione morfologica. Tramite analisi mutiparametriche, il sistema classificativo su base molecolare si è rivelato una variabile con un valore dipendente se paragonato all'invasività ed al grado, che si dimostrano indipendenti. Questi risultati suggeriscono che, attualmente, si deve applicare con cautela tale sistema classificativo al cane, specie nella quale le informazioni più rilevanti ai fini della prognosi vengono fornite dall'invasività e dal grado.

7- BIBLIOGRAFIA

- Ahern TE, Bird RC, Bird AEC, Wolfe LG: Expression of the oncogene c-*erbB-2* in canine mammary cancers and derived cell lines. *American journal of veterinary research*, 1996; 57:693-696.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 2000; 403:503-511.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2007*. 2007; Atlanta. http://www.cancer.org/downloads/STT/Global_Cancer_Facts_and_Figures_2007_rev.pdf.
- Amparo RS, Angel CD, Ana LH, Antonio LC, Vicente MS, Carlos FM, Vicente GP: Inflammatory breast carcinoma: pathological or clinical entity? *Breast Cancer Research and Treatment*, 2000; 64:269-273.
- Andrè F, Domont J, Delalogue S: What can breast cancer molecular sub-classification add to conventional diagnostic tools? *Ann Oncol*, 2007; 18(Suppl 9): ix33-ix36 doi: 10.1093/annonc/mdm291.
- Attia-Sobol J, Ferriere JP, Cure H, Kwiatkowsky F, Achard JL, Verrelle P, Feillel V, De Latour M, Lafaye C, Deloche C: Treatment results, survival and prognostic factors in 109 inflammatory breast cancers: univariate and multivariate analysis. *European Journal of Cancer*, 1993; 29:1081-1088.
- Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ: Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observation in beagles. *Veterinary Pathology*, 1999; 36:423-436.
- Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L: Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer

- patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature medicine*, 1995; 1:1029-10341.
- Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, Birnbaum D: How basal are triple-negative breast cancer? *International Journal of Cancer*, 2008; 123(1):236-40.
 - Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Cervera N, Tarpin C, Nguyen C, Xerri L, Houlgatte R, Jacquemier J, Viens P, Birnbaum D: Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. *Cancer Research*, 2005; 65(6):2170-2180.
 - Bonnier P, Charpin C, Lejeune C, Romain S, Tubiana N, Beedassy B, Martin PM, Serment H, Piana L: Inflammatory carcinomas of the breast: a clinical, pathological, or a clinical and pathological definition? *International Journal of Cancer*, 1995; 62:382-385.
 - Bostock DE, Moriarty J, Crocker J: Correlation between histologic diagnosis mean nuclear organizer region count and prognosis in canine mammary cancer. *Veterinary Pathology*, 1992; 29:381-385.
 - Bratulic M, Grabarevic Z, Artukovic B, Capak D: Number of nucleoli and nucleolar organizer regions per nucleus and nucleolus-prognostic value in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 1996; 33:527-532.
 - Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Monari I, Benazzi C: E-cadherin and β -catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumours. *Veterinary Pathology*, 2005; 42: 781-787.
 - Callahan R e Campbell G: Mutations in human breast cancer: an overview. *Journal of the National Cancer Institute*, 1989; 81 (23):1780-1786.
 - Chang S, Parker SL, Pham T, Buzdar AU, Hursting SD: Inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance epidemiology, and end results program of the National Cancer Institute. 1975-1992. *Cancer*, 1998; 82:2366-2372.

- Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO: Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical Cancer Research*, 2008; 14(5): 1368-1376.
- Conforti R, Boulet T, Tomasic G, Taranchon E, Arriagada R, Spielmann M, Ducourtieux M, Soria JC, Tursz T, Delaloge S, Michiels S, Andre F: Breast cancer molecular subclassification and estrogen receptor expression to predict efficacy of adjuvant anthracyclines-based chemotherapy: a biomarker study from two randomized trials. *Annals of Oncology*, 2007; 18 (9): 1477-1483.
- Contesso G, Mouriessse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J: The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *Journal of Clinical Oncology*, 1987; 5: 1378-1386.
- Courjal F e Theillet C: Comparative Hybridization Analysis of Breast Tumors with Predetermined Profiles of DNA Amplification. *Cancer Research*, 1997; 57:4368-4377.
- Cotchin E: Mammary neoplasms of the bitch. *Journal of Comparative Pathology*, 1958; 68:1-22.
- De las Mulas MJ, Millán Y, Dios R: A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology*, 2005; 42:200-212.
- De las Mulas MJ, Ordás J, Millán Y, Fernández-Soria V, Ramón y Cajal S: Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2003; 80:363-367.
- Dorn CA, Taylor DON, Scheneider R: Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California II. Cancer morbidity in dogs

- and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute*, 1968; 40:307-318.
- Elis DL e Teitelbaum SL: Inflammatory carcinoma of the breast: a pathologic definition. *Cancer*, 1974; 33:1045-1047.
 - Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, Peterse JL, Mukai K, Tabar, Jacquemier J, Cornellisse CJ, Sasco AJ, Kaaks R, Pisani P, Goldgar DE, Devilee P, Cleton-Jansen MJ, Borrense-Dale AL, van't Veer L, Sapino A: Metaplastic Breast Carcinoma. In: Tavassoli FA, Devilee P (eds) *Tumours of the breast of the female genital organs*, 2003. World Health Organization classification of tumours. IARC Press Lyon, pp 37-41.
 - Fowler EH, Wilson GP, Koestner A: Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. *Veterinary Pathology*, 1974; 11:212-229.
 - Gama A, Alves A, Schmitt F: Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv*, 2008a; 453:123-132.
 - Gama A, Paredes J, Gärtner F, Alves A, Schmitt F: Expression of E-cadherin, P-cadherin and b-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Veterinary Journal*, 2008b; 177: 45-53.
 - Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI, Black MM: Canine mammary epithelial neoplasms: biological implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*, 1983; 20:127-142.
 - Giordano SH e Hortobagyi GN: Inflammatory breast cancer: clinical progress and the main problems that must be addressed. *Breast Cancer Research*, 2003; 5:284-288.
 - Graham JC e Myers RK: The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 1999; 13:416-418.

- Hampe JF e Misdorp W: Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organization*, 1974; 50:111-133.
- Hellmén E: Complex mammary tumours in the female dog: a review. *The Journal of Dairy Research*, 2005; 72: 90-97.
- Hellmén E, Bergstrom R, Holmberg L, Spangberg I-B, Hansson K, Lindgren A: Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology*, 1993; 30:20-27.
- Hellmén E, Lindgren A, Linell F, Matsson P, Nilsson A: Comparison of histology and clinical variables to DNA ploidy in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 1988; 25:219-226.
- Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish B, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L, Nobel A, Parker J, Ewend M, Sawyer LR, Wu J, Liu Y, Nanda R, Trtiakova M, Orrico AR, Dreher D, Palazzo JP, Perreard L, Nelson E, Mone M, Hansen H, Mullins M, Quackenbush JF, Ellis MJ, Olopade OI, Bernard PS, Perou CM: The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, 2006; 7:96.
- Irvin WJ e Carey LA: What is triple-negative breast cancer? *European Journal of Cancer*, 2008; 44(18):2799-805.
- Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Hortobagyi G: Inflammatory breast cancer: a review. *Journal of Clinical Oncology*, 1992; 10:1014-1024.
- Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A: Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of human grading method. *Journal of Comparative Pathology*, 2005; 133:246-252.
- Kim M-J, Ro JY, Ahn S-H, Kim HH, Kim S-B, Gong G: Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Human pathology*, 2006; 37:1217-1226.

- Kleer CG, van Golen KL, Merajver SD: Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. *Breast Cancer Research*, 2000; 2:423-429.
- Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, van de Vijver MJ: Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Research*, 2007; 9(5):R65.
- Kuroda N, Fujishima N, Inoue K, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Kayashi Y, Lee G-H: Basal-like carcinoma of the breast: further evidence of the possibility that most metaplastic carcinomas may be actually basal-like carcinomas. *Med Mol Morphol*, 2008; 41:117-120.
- Laasko M, Tanner M, Nilsson J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmström P, Wilking N, Bergh J, Isola J: Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 2006; 12(14): 4185-4191.
- Lagadic M e Estrada M: Tumeurs mammaires de la chienne: critères du pronostic histologique et intérêt d'un grading. *Recueil de Médecine Vétérinaire Spécial Cancérologie*, 1990; 166(11):1035-1042.
- Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY, Kweon OK: Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, 2004; 5:63-69.
- Lien HC, Lin CW, Mao TL, Kuo SH, Hsiao CH, Huang CS: p53 overexpression and mutation in metaplastic carcinoma of the breast: genetic evidence for a monoclonal origin of both the carcinomatous and the heterogeneous sarcomatous components. *Journal of Pathology*, 2004; 204:131-139.
- Lizard-Nacol S, Lidereau R, Collin F, Arnal M, Hahnel L, Roignot P, Cuisenier J, Guerrin J: Benign Breast Disease: Absence of Genetic Alterations

at Several Loci Implicated in Breast cancer Malignancy. *Cancer Research*, 1995; 55:4416-4419.

- Lønning PE: Study of suboptimum treatment response: lessons from breast cancer. *The Lancet Oncology*, 2003; 4:177-85.
- Lønning PE, Sørli T, Børresen-Dale A-L: Genomics in breast cancer-therapeutic implications. *Nature clinical practice. Oncology*, 2005; 2:26-33.
- Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Sakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, Muir B, Mohapatra G, Salunga R, Tuggle JT, Tran Y, Tran D, Tassin A, Amon P, Wang W, Wang W, Enright E, Stecker K, Estepa-Sabal E, Smith B, Younger J, Balis U, Michaelson J, Bhan A, Habin K, Baer TM, Brugge J, Haber DA, Erlander MG, Sgroi DC: A two gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*, 2004; 5:607-616.
- Marcato PS: Ghiandole mammarie. In: *Patologia Sistemica Veterinaria*, Ed. Edagricole, Bologna, 2002; pp 1045-1093.
- Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F: p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Archiv*, 2005; 447:688-694.
- Matos AJ, Lopes CC, Faustino AM, Carvalheira JG, dos Santos MS, Rutteman GR, Gartner MF: MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer research*, 2006; 26:1821-1826.
- Matos AJ, Lopes CC, Faustino AM, Carvalheira JG, Rutteman GR, Gartner MF: E-cadherin, beta-catenin, invasion and lymph node metastases in canine malignant mammary tumors. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 2007; 115:327-334.
- Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A: Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, 2005a; 79:225-232.

- Millanta F, Calandrella M, Citi S, Della Santa D, Poli A: Overexpression of HER-2 in Feline Invasive Mammary Carcinomas: Immunohistochemical Survey and Evaluation of Its Prognostic Potential. *Veterinary Pathology*, 2005b; 42:30-34.
- Misdorp W: Tumours of the mammary gland. In: Meuten D.J. (ed) *Tumours in domestic animals*. 4th edn. Iowa State Press, Iowa, 2002; pp 575-606.
- Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP: Histological classification of mammary tumours of the dog and the cat, Vol VII, 2nd series. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington D.C, and the World Health Organization Collaborating Centre for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999; pp 1-59.
- Misdorp W e Hart AA: Prognostic factor in canine mammary cancer. *Journal of the Natural Cancer Insitute*, 1976; 56:779-786.
- Monlux AW, Roszel JF, MacVean DW, Palmer TW: Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. *Veterinary Pathology*, 1977; 14:194-217.
- Moulton JE: Tumors of the mammary gland. In: *Tumors in Domestic Animals*, ed. Moulton JE, 3rd ed, pp. 518-552. University of California Press, Berkeley, CA, 1990.
- Nerurkar VR, Chitale AR, Jalnakurpar BV, Naik SN, Lalitha VS: Comparative pathology of canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 1989; 101:389-397.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM: Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2004; 10:5367-5374.

- Parodi AL: Les éléments du pronostic des cancers mammaires de la chienne. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 1983; 18:31-36.
- Peña LL, Nieto AI, Perez-Alenza D, Cuesta P, Castaño M: Immunohistochemical detection of Ki67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathological variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1998; 10: 237-246.
- Peña L, Perez Alenza MD, Rodriguez-Bertos A, Nieto A: Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2003; 78:141-178.
- Peppercorn J, Perou CM, Carey LA: Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Investigation*, 2008; 26:1-10.
- Perez Alenza MD, Jimenez A, Nieto A, Peña L: First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Research*, 2004; 6:R300-R307.
- Perez Alenza MD, Peña L, del Castillo N, Nieto AI: Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*, 2000; 41:287-291.
- Perez Alenza MD, Tabanera E, Peña L: Inflammatory mammary carcinoma of the dog: 33 cases (1995-1999). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 2001; 219:1110-1114.
- Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge Ø, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børrensen-Dale A-L, Brown PO, Botstein D: Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, 2000; 406: 747-752.
- Popov Z, Hoznek A, Colombel M, Bastuji-Garin S, Lefrere-Belda MA, Bellot J, Abbou CC, Mazerolles C, Chopin DK: The prognostic value of p53 nuclear

overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer*, 1997; 80:1472-1481.

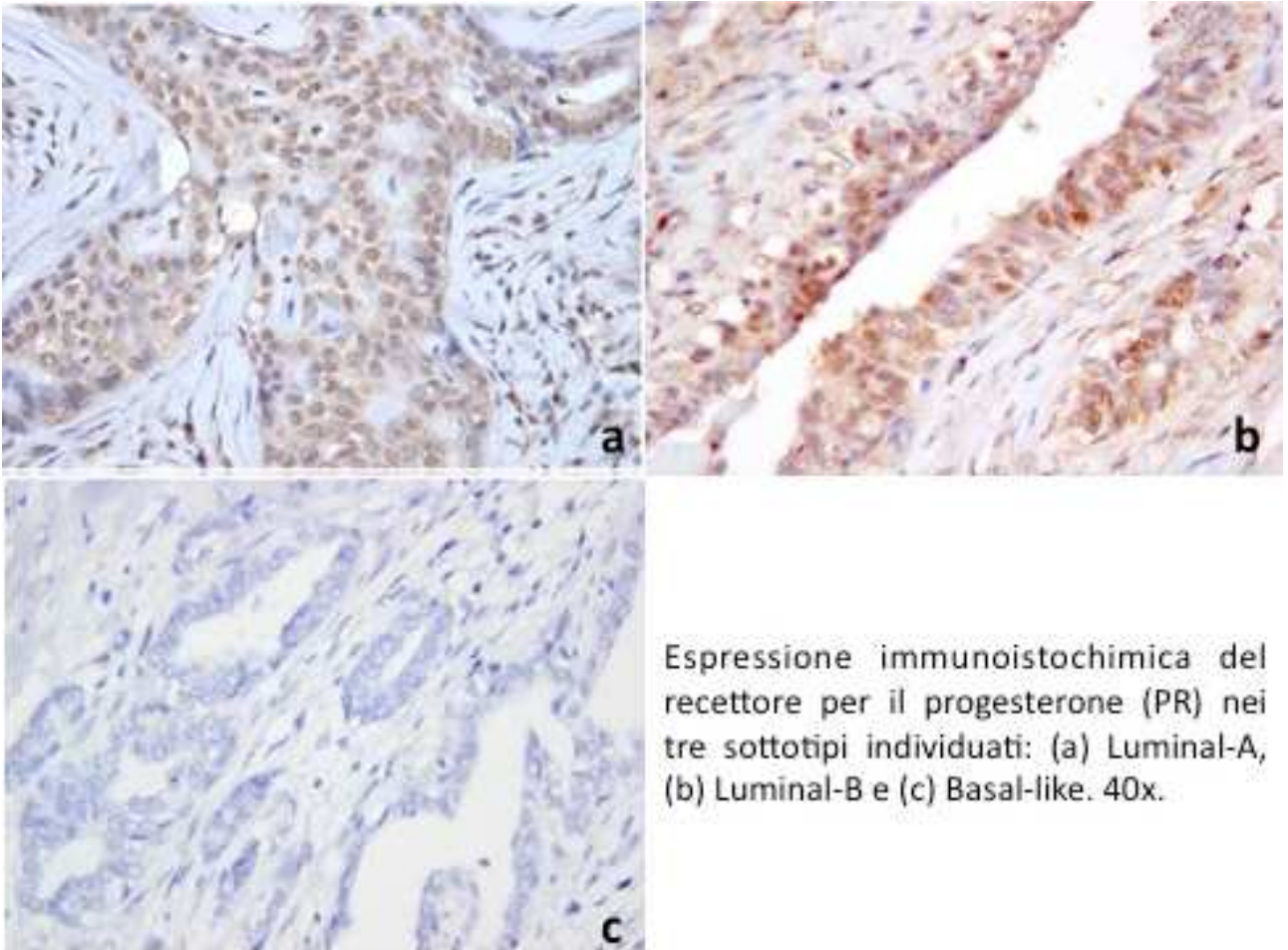
- Rakha EA, Ellis I, Reis-Filho JS: Are triple-negative and basal-like breast cancer synonymous? *Clinical Cancer Research*, 2008; 14(2):618.
- Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, Ellis IO: Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2008; in stampa.
- Reid JF, Lusa L, De Cecco L, Coradini D, Veneroni S, Daidone MG, Gariboldi M, Pierotti MA: Limits of predictive models using microarray data for breast cancer clinical treatment outcome. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005; 97:927-930.
- Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY: The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 2006; 59:225-231.
- Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess KR, Stec J, Ayers M, Wagner P, Morandi P, Fan C, Rabiul I, Ross JS, Hortobagyi GN, Pusztai L: Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 2005; 11(16):5678-5685.
- Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG: Tumors of the mammary gland. In: Withrow S.J, macewen B.R. (eds) *Small animal clinical oncology*. Saunders, Philadelphia, 2001; pp 455-477.
- Saltzstein SL: Clinical occult inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer*, 1974; 34:382-388.
- Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G, Marcato PS: Prognostic value of histological stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2002; 14(1): 25-34.
- Sassi F, Vinci A, Morandi F, Benazzi C, Sarli G: Complex and mixed patterns of canine mammary tumours are defective of specific myoepithelial markers.

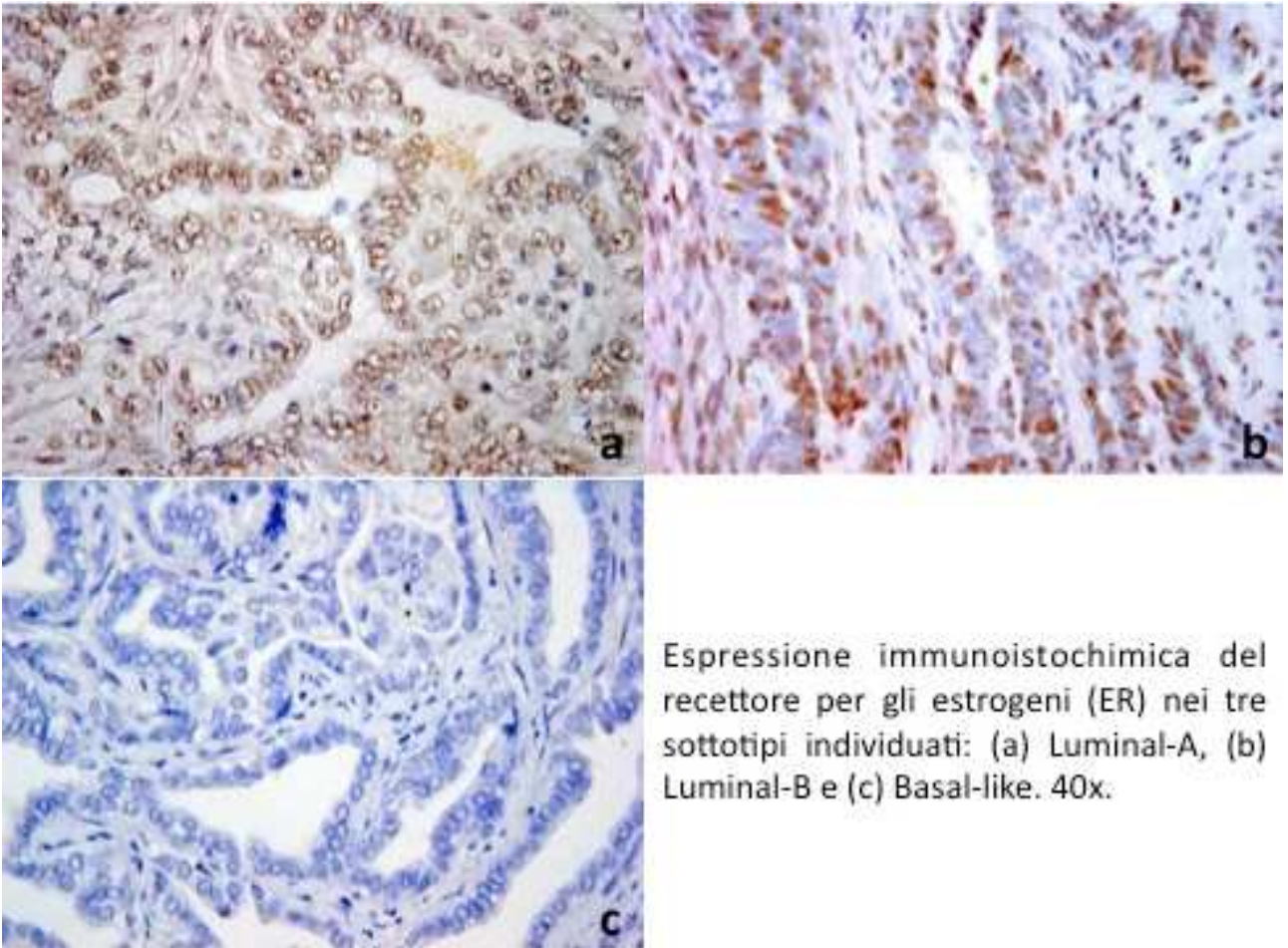
Atti del 25th Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, 29 Agosto-1 Settembre 2007 Munich Germany, p. 188.

- Schafer KA, Kelly G, Schrader R, Griffith WC, Muggenburg BA, Tierney LA, Lechner JF, Janovitz, EB, Hahn FF: A canine model of familial mammary gland neoplasia. *Veterinary Pathology*, 1998; 35:168-177.
- Sørli T: Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *European Journal of Cancer*, 2004; 40:2667-2675.
- Sørli T, Perou CM, Fan C, Geisler S, Aas T, Nobel A, Anker G, Akslen LA, Botstein D, Børresen-Dale A-L, Lønning PE: Gene expression profiles do not consistently predict the clinical treatment response in locally advanced breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006; 5(11): 2914-2818.
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale A-L: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001; 98 (19):10869-10874.
- Sørli T, Tibshirani R, Parkel J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, n H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale A-L, Botstein D: Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003; 100 (14):8418-8423.
- Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET: Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003; 100:10393-10398.

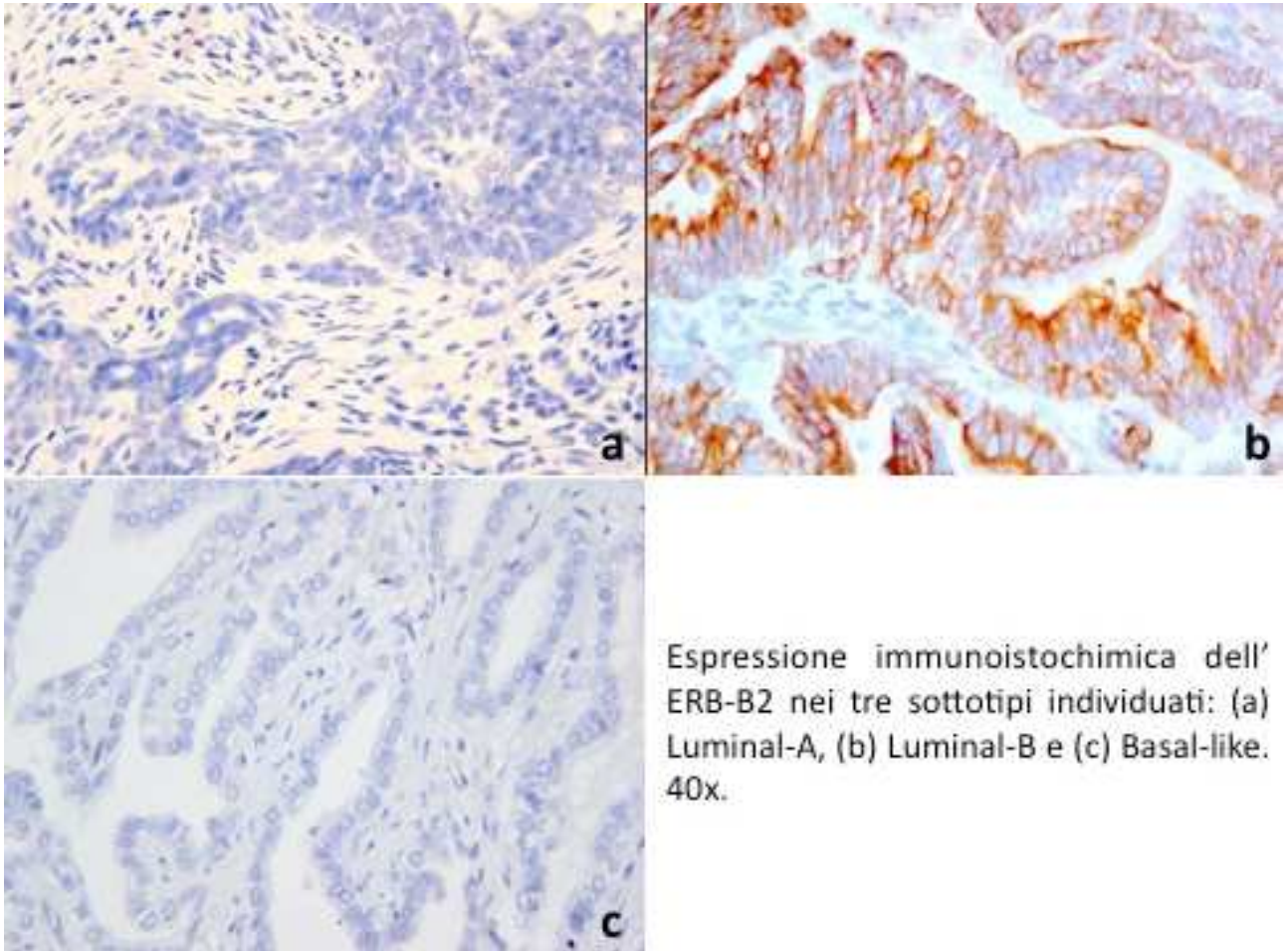
- Susaneck SJ, Allen TA, Hoopes J, Withrow SJ, Macy DW: Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *Journal of American Animal Hospital Association*, 1983; 9:971-976.
- Tavassoli FA: Infiltrating carcinoma: special type. Inflammatory carcinoma. *In Pathology of the breast 2nd edition*. New York: McGraw-Hill, 1999:538-541.
- Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LFA, de Jong D, Van de Vijer MJ, van't Veer LJ, Peterse JL: Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *Journal of Pathology*, 2008; 216:141-150.
- Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS: Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancer: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2008; doi 10.1007/s10549-008-0197-9.
- Yang XR, Sherman ME, Rimm DL, Lissowska J, Brinton LA, Peplonska B, Hewitt SM, Anderson WF, Szeszenia-Dąbrowska N, Bardin-Mikolajczak A, Zatonski W, Cartun R, Mandich D, Rymkiewicz G, Ligaj M, Lukaszek S, Kordek R, García-Clasas M: 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*, 2007; 16 (3):439-443.
- Zaidan Dagli ML: The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumours: a promising outlook. *Veterinary Journal*, 2008; 177:3-5.

8- *ICONOGRAFIA*

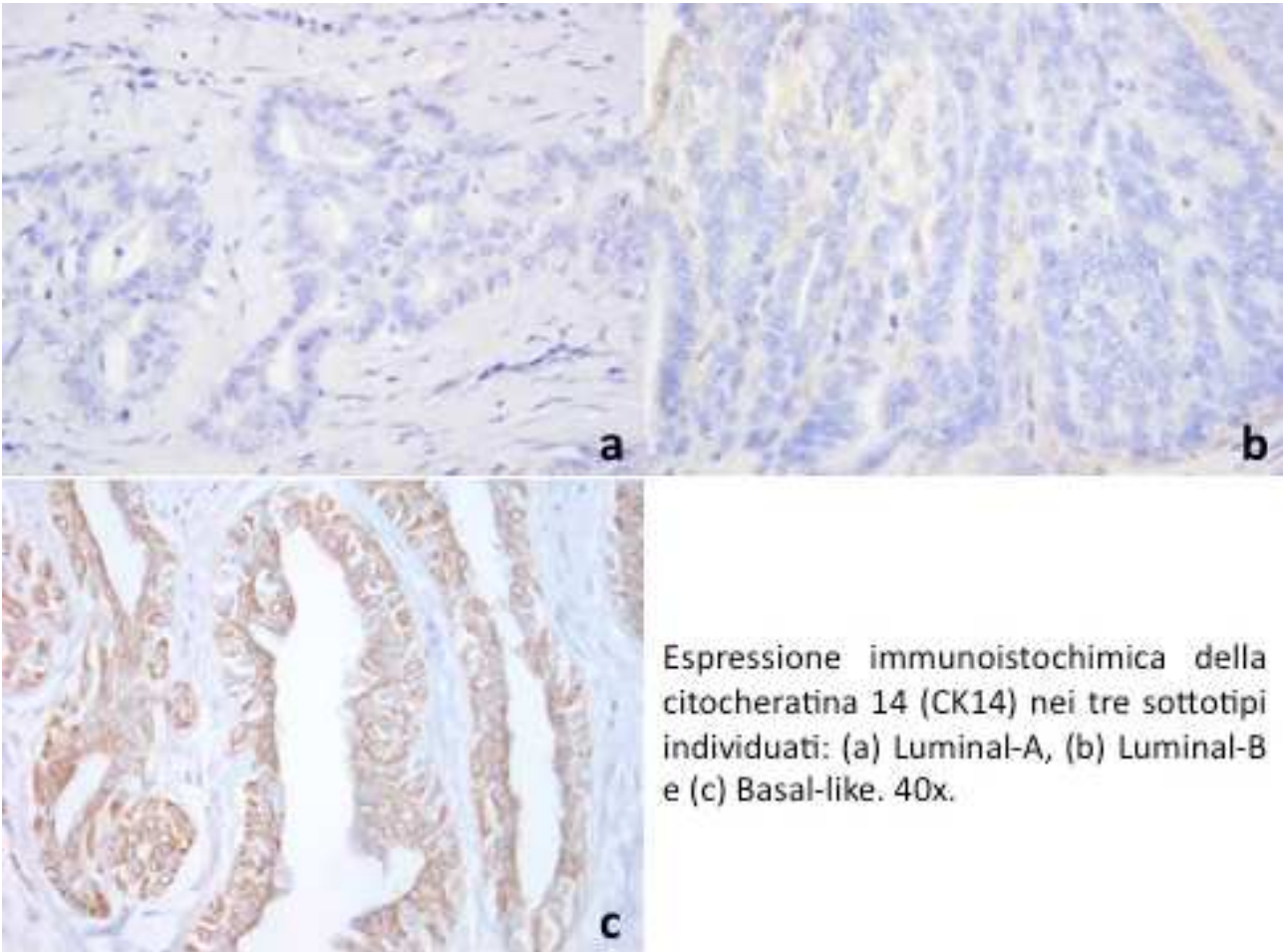




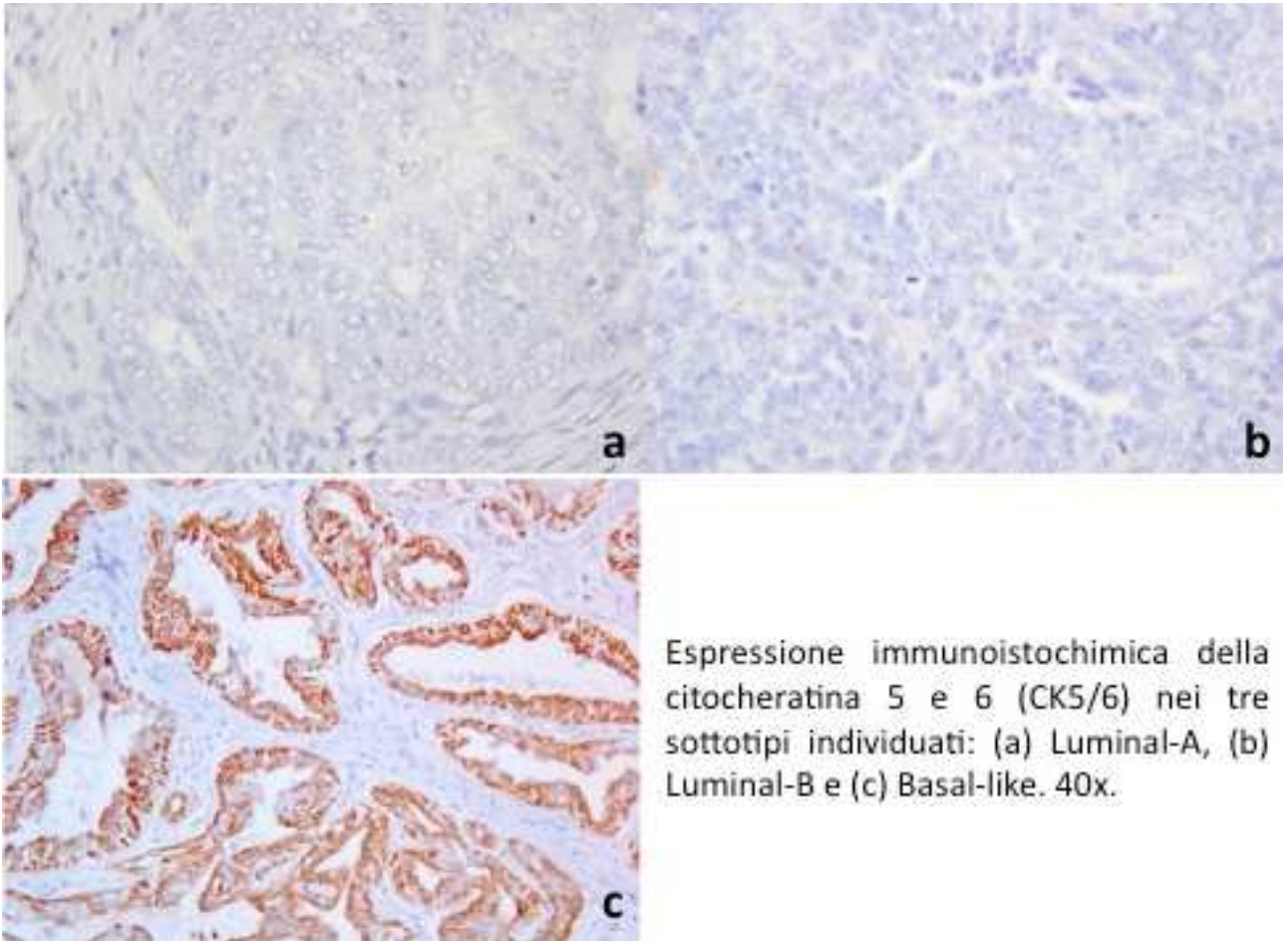
Espressione immunoistochimica del recettore per gli estrogeni (ER) nei tre sottotipi individuati: (a) Luminal-A, (b) Luminal-B e (c) Basal-like. 40x.



Espressione immunoistochimica dell' ERB-B2 nei tre sottotipi individuati: (a) Luminal-A, (b) Luminal-B e (c) Basal-like. 40x.



Espressione immunoistochimica della citocheratina 14 (CK14) nei tre sottotipi individuati: (a) Luminal-A, (b) Luminal-B e (c) Basal-like. 40x.



Espressione immunoistochimica della citocheratina 5 e 6 (CK5/6) nei tre sottotipi individuati: (a) Luminal-A, (b) Luminal-B e (c) Basal-like. 40x.