

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA
DISCIPLINE ANATOMOISTOPATOLOGICHE
VETERINARIE**

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: VET/ 03

TUMORI UTERINI E MAMMARI DELLA CONIGLIA

Presentata da: Dott.ssa Annachiara Vinci

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof.
Paolo Stefano Marcato

Relatore

Chiar.mo Prof.
Giuseppe Sarli

Esame finale anno 2008

INTRODUZIONE

Il presente lavoro riguarda le neoplasie uterine e mammarie di più frequente riscontro clinico nei conigli domestici, argomento attuale soprattutto alla luce della grande diffusione degli stessi come animali d'affezione. Il lavoro svolto ha lo scopo di documentare in maniera organica le più comuni patologie neoplastiche segnalate in questa specie. Tuttavia le informazioni e il materiale bibliografico reperito in merito riguardano prevalentemente i conigli di allevamento appartenenti al genere degli *Oryctolagus cuniculus* maggiormente osservati e studiati nel corso degli anni rispetto alle razze attuali da compagnia. Benchè nella maggior parte delle specie di mammiferi domestici l'utero rappresenti una sede rara di neoplasia, nella coniglia è invece l'organo maggiormente soggetto all'insorgenza di tumori e l'adenocarcinoma è sicuramente la forma che si rileva con maggior frequenza. Le neoplasie mammarie segnalate nella coniglia riguardano prevalentemente gli adenocarcinomi e rare forme di adenomi ad insorgenza spontanea. L'incidenza di entrambe le neoplasie, sia uterine che mammarie, è influenzata inoltre da fattori predisponenti comuni quali l'età, la razza ed le stimolazioni ormonali.

1. L'UTERO DELLA CONIGLIA

Conformazione anatomica e aspetto istologico

La coniglia possiede un utero duplice costituito cioè da due corna distinte, ognuna con un suo collo, lunghe circa 10-12 cm e larghe da 4 a 6 mm, unite solo mediante le estremità caudali. La parte caudale di fusione delle due corna, lunga circa 2 cm, è rivestita da un'unica sierosa e nella porzione interna sono presenti due solchi, uno dorsale e uno ventrale, che segnano il limite tra le due parti. Il collo dell'utero è lungo circa 15-20 mm mentre la porzione vaginale circa 4-5 mm. Nel complesso l'utero è costituito da tre strati: **sierosa o perimetrio, miometrio o muscolare, mucosa o endometrio**. Macroscopicamente la mucosa uterina della coniglia mostra un colore grigio-rossastro e numerose pieghe longitudinali che appaiono frastagliate per la presenza di incisure e che diventano molto alte nella settimana che segue l'ovulazione, tanto da occupare gran parte del lume uterino formando il così detto "merletto endometriale". Le pieghe longitudinali della mucosa presenti nella porzione vaginale dell'utero si riflettono radialmente sul versante esterno a formare una specie di "fiore sbocciato" (Barone, 1994). Istologicamente il perimetrio è costituito da tessuto connettivo elastico rivestito in superficie dal mesotelio peritoneale, il miometrio è invece formato da tre strati: uno *superficiale o longitudinale* i cui fasci di cellule muscolari lisce sono orientati longitudinalmente, uno *medio* che accoglie un grosso plesso vascolare il cui sviluppo è notevole al momento dell'estro e soprattutto durante la gravidanza e uno *profondo o circolare* le cui fibre muscolari presentano un andamento trasversale. L'endometrio comprende un epitelio colonnare semplice più superficiale ed una lamina

propria sottostante anche detta “stroma endometriale” formata da tessuto connettivo lasso ricco di cellule (fibroblasti, mastociti, macrofagi, linfociti, eosinofili) e fibre collagene. Nello spessore dell’endometrio sono presenti le ghiandole uterine di tipo tubulare-semplice, poco ramificate, con un epitelio simile a quello della superficie endometriale; nelle femmine adulte queste ghiandole presentano delle grosse variazioni legate all’attività ovarica. Nei periodi di riposo sono poco stipate, con un epitelio cubico o prismatico basso ed un lume stretto ed ostruito da residui di secreto mentre, durante il pro-estro, si allungano, si ramificano e diventano flessuose, inoltre si approfondano nell’endometrio così che le estremità si insinuano fra i fasci del miometrio. Inoltre durante questa fase le ghiandole si allargano, l’epitelio diventa più alto, le cellule si moltiplicano e assumono caratteri di attività secernente che raggiunge la sua massima espressione durante l’estro (Monesi, 1994).

2. TUMORI DELL’UTERO DELLA CONIGLIA

I tumori uterini possono essere di tipo epiteliale (adenomi, adenocarcinomi e polipi) e di tipo mesenchimale (fibromi, fibrosarcomi, leiomiomi, leiomiosarcomi, lipomi, linfo sarcomi, rabdomiosarcomi) (Marcato et. al., 2002). Dall’esame della letteratura pertinente emerge inoltre un’altra neoplasia mesenchimale maligna, il deciduosarcoma, menzionata ma meno frequente in questa specie. Secondo quanto sostenuto da diversi autori, nella coniglia l’adenocarcinoma uterino è una neoplasia di frequente riscontro sia clinico che anatomo-patologico mentre rappresenta un evento estremamente più raro nelle altre specie domestiche (Jones, 1997, Marcato, 2002). Già nel 1927 Polson

aveva osservato che circa il 50% delle neoplasie segnalate nelle coniglie appartengono a questa categoria (Polson, 1927). Gli adenomi risultano poco segnalati.

ADENOCARCINOMA DELL'UTERO

É la forma più comunemente riscontrata nella specie e colpisce prevalentemente soggetti adulti (Brown, 2002). Si tratta di un tumore a crescita lenta con un decorso clinico che va dai 12 ai 24 mesi (Hillyer, 1994) e la cui insorgenza può verificarsi spontaneamente oppure secondariamente a lesioni endometriali non neoplastiche. Marcato (2002) riferisce che la comparsa della neoplasia spontanea sia legata a turbe riproduttive che si verificano nei 6-10 mesi precedenti.

Età di insorgenza

La diffusione del coniglio come animale d'affezione permette facilmente il raggiungimento di età avanzata (dai 3 anni in su) che favorisce lo sviluppo della patologia. Ingalls et. al., nel 1964 hanno stabilito che l'età è un fattore importante nello sviluppo della neoplasia e non hanno osservato alcun tumore nelle coniglie con età inferiore ai 2 anni e mezzo, mentre hanno riscontrato la neoplasia in 11 coniglie su 12 con età superiore ai 4 anni, 3 delle quali morte per carcinomatosi (Ingalls et. al., 1964). Secondo Elsinghorst et. al. (1984) il carcinoma endometriale insorge raramente nelle coniglie con un'età inferiore ai tre anni e la sua incidenza aumenta con l'età dell'animale (Elsinghorst et. al., 1984). Greene e Saxton (1938) hanno riscontrato frequentemente

il tumore in animali con età dai 5 ai 6 anni (27,1%) e in nessun caso negli animali con età inferiore ai 2 anni. I soggetti colpiti da adenocarcinoma osservati da Baba e Von Haam (1972) avevano un'età compresa tra i 4 e i 7 anni mentre Greene (1958) ha mostrato un'incidenza della neoplasia del 4,2% in animali con età da 2 a 3 anni e del 79,1% in soggetti con età compresa tra i 5 e i 6 anni (Greene, 1958). Lansdown et. al., (1980) hanno descritto un caso di adenocarcinoma uterino che possiamo considerare isolato poiché insorto in un animale di appena sei mesi (Lansdown et. al., 1980). Alla luce di questi dati si può affermare che l'incidenza aumenta con il passare degli anni nelle coniglie non sterilizzate: secondo Harkness et. al. (1995) l'incidenza oscilla tra 50 e 80% nelle coniglie con età superiore ai tre anni, mentre in quelle con età inferiore sarebbe appena del 4%. Brown (2002) infine ha considerato un evento raro che un coniglio non sterilizzato raggiunga i 5 anni d'età senza la comparsa del tumore uterino affermando che, in ogni caso, vi è una alta probabilità che il tumore si sviluppi attorno al settimo anno (Brown, 2002).

Razze colpite

Le indagini svolte nel corso degli anni per definire il ruolo della razza come cofattore nell'insorgenza della neoplasia, non sono state sempre univoche. Secondo Marcato (2002) l'adenocarcinoma è il tumore più frequente in *Oryctolagus cuniculus*. Weisbroth (1974) ha definito l'adenocarcinoma uterino la neoplasia più frequentemente riscontrata nei conigli selvatici mentre, secondo Harkness e Wagner (1995) sono i conigli domestici (pets) quelli più soggetti a sviluppare il tumore.

L'indagine di Burrows (1940) sulle neoplasie uterine ed i tumori mammari nei conigli di allevamento condotta su 25 coniglie di diverse razze (tedesche, lepri del belgio e razze miste) ha evidenziato una alta incidenza degli adenocarcinomi uterini rispetto ad altre neoplasie, ma non ha mostrato alcuna relazione tra la razza dell'animale e l'incidenza del tumore (Burrows, 1940). Kurotaki et. al. (2007) ha affermato che quasi tutte le razze possono essere colpite dal tumore mentre Goto et al. (2006) hanno considerato la razza dei conigli bianchi neozelandesi quella maggiormente colpita. Greene, nel 1958, ha stilato una lista delle razze, in ordine decrescente, relativa all'incidenza del tumore: polacche, imalaiane, bavaresi, cincillà, inglesi, tedesche, Francesi e tan. Ha rilevato quindi un'incidenza maggiore nelle razze tan (50%) ed una minore in quelle polacche (8,3%). Lansdown al contrario, nel 1980, ha osservato una incidenza maggiore del tumore nelle razze tedesche, francesi argentate e tan rispetto ad altre quali quelle belga e rex. Inoltre in un lavoro del 1958 Greene ha rilevato un'incidenza maggiore della neoplasia nelle razze ibride (21,1%) rispetto alle razze pure (14,2%). Anche Croce (2002) ha considerato le coniglie ibride, in particolare quelle derivanti dall'incrocio di maschi nani con femmine di taglia normale, più predisposte a sviluppare la neoplasia rispetto alle femmine di razza pura (Croce, 2002). Nonostante le contraddizioni iniziali e sebbene i pareri dei diversi autori non siano unanimi la predisposizione di razza è comunque oggi considerata un fattore importante nella patogenesi della neoplasia uterina.

3. CICLO OVARICO E CICLO UTERINO NEI MAMMIFERI

Nel *ciclo ovarico* si succedono due fasi: **fase follicolare** dominata dallo sviluppo del follicolo e dalla secrezione di estrogeni e dipendente dagli ormoni FSH ed LH prodotti dall'ipofisi e **fase luteinica** caratterizzata dallo sviluppo del corpo luteo e dalla secrezione di progesterone ed estradiolo da parte di esso, dipendente dall'LH e dalla prolattina. Durante l'accrescimento del follicolo i livelli ematici di FSH ed LH si mantengono a valori bassi e costanti stimolando la secrezione degli estrogeni; verso la metà del ciclo si verifica un drastico aumento della produzione degli estrogeni da parte del follicolo i quali a loro volta determinano una massiva liberazione di FSH ed LH da parte dell'ipofisi. Circa 9 ore prima dell'ovulazione la produzione di FSH e di LH raggiunge un picco che porta il follicolo ad ovulare. Dopo l'ovulazione il follicolo si trasforma in corpo luteo e i livelli ematici di LH diminuiscono gradualmente stabilizzandosi su valori costanti. L'LH svolge inoltre un'azione luteotropa che inizia già durante il picco e prosegue per tutta la fase luteinica insieme a quella della prolattina che svolge un'attività analoga. Il corpo luteo inizia a produrre progesterone il quale a sua volta determina delle modificazioni che caratterizzano il ciclo uterino e la regressione del corpo luteo stesso se non è avvenuta la fecondazione. In quest'ultimo caso l'HCG che viene prodotto dal trofoblasto e la prolattina ipofisaria determinano la trasformazione del corpo luteo ciclico in corpo luteo gravidico che produce progesterone fino al 4°-5° mese di gravidanza. Contemporaneamente alle modificazioni cicliche dell'ovaio, l'endometrio subisce una serie di cambiamenti morfologici e funzionali che costituiscono il così

detto *ciclo uterino* e sono correlati con l'attività endocrina dell'ovaio. Le fasi del ciclo uterino sono tre: proliferativa o follicolare che dura circa 11-14 giorni, coincide con lo sviluppo del follicolo che secerne gli estrogeni e termina con l'ovulazione. A carico dell'endometrio durante questa fase si verifica un notevole aumento di spessore per l'intensa attività proliferativa delle cellule della tonaca propria e della ghiandole, queste ultime inoltre aumentano di numero e di lunghezza e le cellule accumulano glicogeno. La seconda fase è quella secretiva o luteinica che inizia uno o due giorni dopo l'ovulazione e coincide quindi con la formazione del corpo luteo e dipende dalla secrezione di progesterone ed estradiolo. Durante questa fase l'endometrio diventa edematoso e può aumentare di spessore fino a 5-6 mm. Le ghiandole uterine diventano tortuose e accumulano nel lume secreto mucoide. La terza fase, detta estrale, dura circa 3-5 giorni ed è caratterizzata da notevoli modificazioni vascolari a carico dell'endometrio provocate dalla riduzione dell'attività ormonale del corpo luteo. Se l'uovo viene fecondato la mucosa uterina si trasforma in decidua gravidica. La gonadotropina corionica (HCG) e la prolattina prodotti durante la gravidanza impediscono la regressione del corpo luteo e mantengono alti i livelli del progesterone per tutta la gravidanza (Monesi, 1994).

Ciclo estrale della coniglia

La pubertà della coniglia ha luogo verso i 4-5 mesi d'età. L'attività sessuale dura per quasi tutto l'anno ma è massima in primavera e all'inizio dell'estate e diventa irregolare a partire dalla metà dell'estate fino a scomparire, nella maggior parte dei soggetti, alla fine dell'autunno e all'inizio dell'inverno.

Successivamente ad una gravidanza la fecondazione può avvenire in ogni stagione nei giorni seguenti al parto. Al di fuori di questi periodi la durata dei cicli estrali è irregolare ed è dell'ordine di circa trenta giorni di cui 5-6 di proestro e 2-6 di estro (Baron, 1994). Le ovaie contengono follicoli in diverso stadio di sviluppo che si formano ogni 12-14 giorni, questi producono estrogeni durante le ondate follicolari. L'ovulazione è provocata ed avviene in seguito ad uno stimolo che può essere rappresentato dall'accoppiamento o dalla somministrazione di ormone luteinizzante (LH) o di gonadotropina corionica umana (HCG), tale stimolo determina la rottura del follicolo e la formazione del corpo luteo, responsabile della produzione del progesterone. In assenza di gravidanza il corpo luteo regredisce, se invece si instaura una gravidanza questo permane e il progesterone continua ad essere prodotto (Miller, 1999).

Pseudogravidanza

La pseudogravidanza è una sindrome relativamente comune nelle coniglie caratterizzata clinicamente dalla produzione di latte, da atteggiamenti materni come lo strappamento del pelo e dalla formazione di nidi da parte delle femmine non gravide. La causa scatenante può essere rappresentata da un accoppiamento con un maschio infertile, da un'iniezione di LH o HCG o dalla semplice vicinanza di un maschio. In queste condizioni si verifica un'ovulazione e a carico dell'utero e delle mammelle si manifestano le stesse modificazioni che si osservano normalmente in corso di gravidanza (Knobil e Neill, 1998, Kaufmann et. al., 1971). A conferma di ciò, Kaufmann et. al. (1971) hanno segnalato 4 casi di coniglie d'allevamento con

evidenti manifestazioni cliniche di pseudogavidanza, che erano state tenute nella stessa stanza, ma in gabbie separate, insieme a dei maschi. Le necrosopie eseguite su questi soggetti hanno mostrato varie alterazioni a carico di diversi organi: iperplasia endometriale cistica, adenocarcinoma uterino, persistenza dei corpi lutei nelle ovaie, secrezione latte, iperplasia ed ipertrofia delle cellule acidofile del lobo anteriore dell'ipofisi. Questo tipo di modificazioni sono state osservate anche in corso di pseudogavidanza nei cani, nei gatti e nei ratti (Kaufmann et. al., 1971). Anche in una ricerca di Burrows (1940) 15 su 25 coniglie di razze diverse avevano sviluppato un adenocarcinoma secondariamente a ripetute pseudogavidanze (Burrows, 1940).

Tossiemia gravidica

La tossiemia gravidica rappresenta una condizione patologica che può comparire durante la gravidanza e che determina un danneggiamento del fegato, principale organo coinvolto nell'inattivazione degli estrogeni prodotti. Gli estrogeni che non vengono smaltiti dal fegato danneggiato si accumulano nell'organismo e i recettori dell'utero e delle mammelle diventano più esposti all'attività carcinogenica di questi (Greene, 1958; Cotchin, 1964). Secondo diversi autori la tossiemia gravidica è coinvolta nell'eziologia del carcinoma dell'utero (Greene, 1939, Weisbroth, 1974). Greene (1958) ha affermato che tutti gli animali che sviluppano una neoplasia uterina hanno manifestato, nei primi anni di vita, leggere forme di tossiemia gravidica o hanno subito un danno epatico, come una lipidosi o uno stato di necrosi focale per altre cause. Elsinghorst et. al. (1984) hanno confermato la correlazione tra una patologia

epatica, in particolare in forma cronica, causa di una alterazione nel metabolismo degli estrogeni e l'insorgenza del tumore endometriale (Elsinghorst et. al., 1984). Nonostante diversi studi abbiano trattato questo argomento, non ci sono informazioni precise relative all'eziologia della tossiemia gravidica (Greene, 1958). Anche nella donna le informazioni in merito all'eziopatogenesi di questo disturbo, più comunemente denominato pre-eclampsia e abbastanza comune nell'ultima fase della gravidanza, sono in parte sconosciute e tra le cause di probabile insorgenza ci sono l'ipertensione e le patologie renali preesistenti, l'eccessivo aumento ponderale durante la gravidanza e il diabete mellito (Sibai, 2003). Secondo Baba e Von Haam (1972) nella coniglia si tratta di una patologia ereditaria la cui incidenza è più alta negli ibridi di prima generazione ed è strettamente associata all'insorgenza del tumore uterino (Baba e Von Haam, 1972). Greene (1958) ha valutato che gli ibridi mostrano una incidenza maggiore nella trasmissione di alcune patologie ereditarie costituzionali (come il nanismo) rispetto ai soggetti di razze pure e che la tossiemia gravidica, essendo controllata da fattori di natura endocrina in parte di tipo costituzionale, può essere considerata anch'essa come un fattore ereditario. Inoltre le lesioni che caratterizzano la tossiemia gravidica, nei casi osservati dall'autore, sono apparse simili a quelle prodotte dall'azione di veleni esogeni quali ad esempio il carbonio tetracloruro (Greene, 1958). Somministrazioni sperimentali di questa sostanza hanno mostrato l'insorgenza di fibrosi epatica nei conigli (Hu et. al. 2008).

Fattori ormonali

Un'associazione statisticamente significativa tra l'adenocarcinoma mammario e l'iperplasia della parte intermedia dell'ipofisi suggerisce, secondo Marcato (2002) un disturbo endocrino come base patogenetica dell'adenocarcinoma uterino la quale fa peraltro riferimento anche ad un fattore ereditario come dimostra l'incidenza superiore al 50% in certe colonie di femmine mantenute in vita fino a 6-7 anni (Marcato, 2002). Gli steroidi ovarici, nonostante anche in questo caso esistano pareri discordanti, svolgono un importante ruolo nella patogenesi del tumore uterino. Secondo Quinton et. al. (2003) le coniglie non sterilizzate e quindi soggette ad una continua stimolazione ormonale hanno l'80% di probabilità di sviluppare un carcinoma uterino (Quinton et. al., 2003). Sebbene secondo Kurotaki et. al. (2007) il ruolo di tali ormoni non sia ancora ben chiaro, Jones (1997) ritiene che negli ungulati e nei roditori gli estrogeni svolgano un ruolo primario nell'eziologia della iperplasia endometriale, da alcuni autori considerata una patologia preneoplastica, a differenza del cane e del gatto nei quali invece è il progesterone l'ormone principalmente coinvolto. Comunque è opinione di diversi autori che nei conigli grandi quantità di estrogeni, endogeni o esogeni, inducano un'iperplasia dell'endometrio fino anche a lesioni carcinomatose (Burrows, 1952, Sommers and Meissner, 1957). Elsinghorst et. al.(1984) hanno affermato che anche nella donna come nella coniglia, il carcinoma dell'endometrio ha un'eziologia ormonale principalmente legata agli estrogeni. Patologie ovariche che comportano una maggiore o minore produzione di ormoni sono infatti causa, anche nella donna, di alterazioni come l'iperplasia dell'endometrio che predispongono all'insorgenza del tumore

(Elsinghorst et. al., 1984), in particolare nei soggetti in post-menopausa (Reudrant et. al., 1987). Inoltre nei casi osservati da Kelley e Baker (1963) l'influenza ormonale prolungata nelle donne colpite da iperplasia dell'endometrio e neoplasia ha determinato degli effetti come sanguinamento vaginale, anche in seguito ad isterectomia (Kelley and Baker, 1963). Gli ormoni coinvolti nella genesi delle modificazioni uterine, possono essere di origine sia esogena che endogena. Fonti esogene di estrogeni sono rappresentate da farmaci ad azione estrogenica, da mangimi (in cui estrogeni possono essere utilizzati come promotori di crescita), leguminose e diversi tipi di trifoglio contaminati da micotossine assunti con la dieta di alcune specie animali. Tali sostanze svolgono un ruolo importante soprattutto nei ruminanti. In queste specie infatti gli estrogeni contenuti nelle piante possono risultare maggiormente potenziati a causa del metabolismo batterico del rumine e determinare effetti come infertilità, da temporanea a permanente, modificazioni iperplastiche della cervice con calo della fertilità, prolasso uterino e parti distocici. Indipendentemente dall'origine esogena o endogena di tali ormoni gli effetti legati all'eccessiva o prolungata stimolazione di essi a carico dell'utero sono rappresentati da un'ipertrofia del miometrio e da un'iperplasia dell'endometrio che successivamente possono andare incontro ad ulteriori modificazioni (Jones, 1997). Diversi studi sperimentali hanno documentato l'eziologia ormonale delle patologie uterine nella coniglia, Meissner et. al. ad esempio, nel 1957, hanno somministrato estrogeni a 72 coniglie per valutare l'insorgenza di tali anomalie. Tutti i soggetti hanno sviluppato una iperplasia endometriale e un alto numero di essi anche un carcinoma endometriale, in alcuni casi associato a endometriosi e adenomiosi. L'obiettivo di questa sperimentazione è stato anche

quello di valutare la relazione esistente tra le modificazioni uterine e il diabete mellito e di comparare il modello del coniglio a quello della donna. Infatti è noto che più del 50% dei casi di donne con carcinoma endometriale presenta anche un diabete mellito (Meissner et. al., 1957). Anche Hjartaker et. al. nel 2008, in uno studio condotto sulle neoplasie presenti in associazione al diabete mellito nella donna, hanno suggerito una possibile associazione tra questo e il tumore endometriale (Hjartaker et. al., 2008). Le coniglie esaminate da Meissner et. al. (1957) erano state trattate con Allossana, un tossico che nei roditori determina la distruzione delle cellule beta pancreatiche, responsabili della sintesi dell'insulina. L'obiettivo era quello di indurre sull'endometrio uterino, attraverso lo stato iperglicemico, le stesse modificazioni patologiche osservate nella donna. Nei soggetti in esame non è stata rilevata alcuna relazione tra tali anomalie, causate esclusivamente dall'azione degli estrogeni esogeni e lo stato di iperglicemia. Gli autori hanno così concluso che la condizione di iperglicemia ottenuta sperimentalmente con l'Allossana non determina effetti sull'utero (Meissner et. al., 1957). Al contrario di quanto sostenuto dalla maggior parte degli autori, Baba e Von Haam (1972) hanno rilevato, osservando 117 coniglie di razza tedesca per 30 mesi, che la somministrazione degli estrogeni addirittura riduce l'incidenza del carcinoma endometriale dal 17 al 3% (Baba e Von Haam, 1972).

4. ASPETTO MACROSCOPICO

Dal punto di vista macroscopico gli adenocarcinomi hanno mostrato spesso un aspetto multicentrico, il coinvolgimento di entrambe le corna uterine, un aspetto polipoide con frequente

ulcerazione e una localizzazione nelle pieghe della mucosa in corrispondenza dell'inserzione mesometriale (Baba e Von Haam, 1972) Nello stadio più avanzato hanno mostrato anche un'invasione profonda della muscolatura (Greene, 1958). Baba e Von Haam (1972) hanno rilevato che l'utero colpito dalla neoplasia può mostrare contemporaneamente un'idrometra ed una piometra mentre Davies et. al. (1999) hanno valutato che già l'iperplasia senile o cistica o la formazione di polipi endometriali possono predisporre ad una endometrite o una piometra, prima che insorga la neoplasia (Baba e Von Haam, 1972, Davies et. al., 1999). Inoltre la neoplasia è spesso caratterizzata da noduli neoplastici di 1-5 cm o più di diametro e di solito si accompagna a formazioni cistiche (Marcato, 2002). In un caso documentato da Kurotaki et. al. (2007) l'utero ha mostrato contemporaneamente due neoformazioni corrispondenti a due differenti neoplasie, un adenocarcinoma e un leiomioma, localizzate una per ciascun corno uterino. L'adenocarcinoma era localizzato nel corno di sinistra, a carico dell'endometrio, con dimensioni leggermente inferiori all'altro tumore (25x15x10 mm) e mostrava crescita a cavolfiore (Kurotaki, 2007). La presenza di elementi epiteliali neoplastici, tipici di un carcinoma all'interno di un leiomioma, ha deposto inizialmente per una diagnosi di "Malignant Mixed Mullerian Tumor", neoplasia descritta anche nel coniglio (Goto et. al., 2006) e caratterizzata dalla compresenza nello stesso tumore di elementi proliferati sia epiteliali che mesenchimali. In realtà nel caso riportato da Kurotaki et. al., (2007) le cellule stromali, benchè aumentate di numero, non hanno mostrato una forte attività proliferativa di conseguenza la diagnosi finale è stata quella di "Collision tumor", definita come una neoplasia nella quale si "scontrano" tra loro due tipi di tumori maligni (Kurotaki, 2007). La velocità

di crescita del tumore ha mostrato variazioni notevoli tra gli individui, nella maggior parte dei casi comunque la neoplasia ha mostrato una dimensione di circa 1 cm all'inizio raggiungendo i 5 cm dopo sei mesi (Baba e Von Haam, 1972). Oran e Culter (1964) hanno descritto un caso di adenocarcinoma uterino molto particolare per le dimensioni raggiunte dalla neoplasia. L'utero della coniglia occupava infatti gran parte della cavità addominale con le corna uterine lunghe circa 8 cm e al cui interno era presente una massa di colore grigio-rosa estesa dalla cervice fino alle tube di Falloppio, facilmente staccabile dalla parete dell'utero ad eccezione di piccoli peduncoli di adesione (Oran e Culter, 1964). Sommerville (1998) ha descritto il caso di un adenocarcinoma uterino in cui l'aspetto macroscopico di 2 masse uterine, una di 5 cm e l'altra di 2 cm, era di colore giallastro, con una porzione centrale necrotica e di consistenza compatta alla palpazione. Polson (1927) ha riportato diversi casi di adenocarcinomi uterini, uno dei quali associato ad una massa di colore verde-oliva presente nell'addome caudale, adesa al corno uterino di sinistra, di natura non neoplastica. Si trattava di una litopedia, ovvero di un feto esito di una gravidanza extrauterina, di 4-5 cm collegata al corpo e al corno destro dell'utero attraverso dei filamenti di tessuto connettivo. All'interno dell'utero l'endometrio appariva ipertrofico e mostrava due neoformazioni peduncolate disposte una per ciascun corno sporgenti nel lume. Un secondo caso descritto dallo stesso autore ha mostrato invece una struttura nodulare allungata, di 5x2,5 cm che in sezione è apparsa composta da numerosi noduli di tessuto neoplastico, di consistenza soffice e colore grigio (Polson et. al., 1927). Un caso raro di adenocarcinoma uterino riportato da Lansdown et. al., (1980), insorto in un coniglio di appena 6 mesi, ha mostrato invece diverse masse vascolarizzate localizzate in

entrambe le corna uterine e lesioni simil-cistiche sulla tuba di sinistra.

5. IPERPLASIA DELL'ENDOMETRIO E ADENOCARCINOMA

La relazione tra l'iperplasia cistica e l'adenocarcinoma dell'utero è, secondo alcuni autori poco chiara e contraddittoria. Per interpretare la relazione esistente tra l'iperplasia endometriale e l'adenocarcinoma, secondo Elsinghorst et. al. (1984) è necessario valutare i diversi tipi di iperplasia e la progressione di questi verso forme neoplastiche (Elsinghorst et. al., 1984). Hillyer (1997) ha valutato che l'iperplasia semplice dell'endometrio, associata alle altre modificazioni dell'utero come l'iperplasia cistica, l'iperplasia adenomatosa e l'adenocarcinoma, possono comparire con la stessa frequenza nella coniglia come nella donna (Hillyer, 1997). Secondo Saito et. al. (2002) l'iperplasia cistica dell'endometrio come lesione predisponente alla neoplasia uterina è stata osservata più di frequente nel coniglio rispetto ad altre specie come il cane o il gatto (Saito et. al., 2002). Si tratta di una importante causa di ipofecondità nelle varie specie sia domestiche che da reddito (Marcato, 2002). Greene (1958) ha valutato che nei soggetti colpiti da tossiemia gravidica, che quindi hanno accumulato estrogeni in circolo, l'endometrio va incontro innanzitutto ad una iperplasia cistica prima dell'insorgenza della neoplasia uterina (Greene, 1958). Saito et. al. (2002) hanno valutato 14 casi di conigli con patologia della riproduzione tra i quali il 29,8% dei casi avevano presentato un'iperplasia cistica dell'endometrio alla quale nel 21,3 % dei casi era seguito un adenocarcinoma. Mentre Hillyer nel 1997 ha

confermato la correlazione esistente nella coniglia tra l'iperplasia dell'endometrio e l'adenocarcinoma, secondo Marcato (2002) l'iperplasia dell'endometrio può essere considerata una lesione precancerosa solo nella donna. I casi osservati da Meissner et. al. (1956) hanno mostrato forme di iperplasia dell'endometrio e dell'epitelio endocervicale e ipertrofia del miometrio che solo in alcuni casi sono apparsi associati ad un adenocarcinoma, probabilmente a causa della soppressione di alcuni dei soggetti prima che la neoplasia potesse insorgere (Meissner et. al., 1956). Nonostante la maggior parte delle segnalazioni abbiano riportato casi di neoplasie derivanti da endometri iperplastici, un certo numero di neoplasie sono invece state rilevate all'interno di uteri atrofici. Inoltre in alcuni casi l'atrofia e l'iperplasia endometriale sono state riscontrate all'interno dello stesso organo (Elsinghorst et. al., 1984). Anche l'atrofia senile dell'endometrio sembra svolgere quindi un ruolo significativo nell'insorgenza della neoplasia e anche in questo caso le opinioni in merito non sono state sempre unanimi (Croce, 2002, Harkness e Wagner, 1995, Hillyer, 1997). Baba e Von Haam (1972) hanno rilevato una forte correlazione tra displasia e carcinoma "*in situ*" con l'atrofia senile dell'endometrio, ma nessuna correlazione del tumore con l'iperplasia ghiandolare o cistica, a differenza di quanto affermato da altri autori e di quanto accade nella donna (Baba e Von Haam, 1972). Infine Elsinghorst et. al. (1984) hanno considerato l'atrofia senile dell'endometrio e l'adenocarcinoma due eventi strettamente associati ritenendo invece più complesso il rapporto tra la neoplasia e l'iperplasia cistica (Elsinghorst et. al., 1984).

6. IPERPLASIA DELL'ENDOMETRIO

Aspetto istologico

L'iperplasia semplice si presenta con un lieve ispessimento diffuso o a focolaio dell'endometrio (quest'ultimo più frequente nella cagna e nella gatta) e non sempre facilmente diagnosticabile macroscopicamente; la formazione di cisti (iperplasia cistica) rende invece le lesioni più facilmente riconoscibili (Marcato, 2002). Polson (1927) ha considerato l'iperplasia come la prima di varie modificazioni che possono insorgere nell'endometrio della coniglia, in seguito alla quale si assiste ad una graduale perdita della distinzione tra lo strato endometriale e quello muscolare poichè la porzione ghiandolare dell'endometrio invade la muscolatura uterina. Questo processo è accompagnato da una proliferazione delle cellule alveolari che porta alla formazione di un adenoma. In alcuni casi le cellule hanno mostrato una attività proliferativa più spiccata formando acini di cellule epiteliali con aspetto solido (Polson, 1972). Le caratteristiche istologiche dell'iperplasia endometriale nelle principali specie domestiche sono rappresentate, nelle prime fasi del processo, da uno stroma edematoso con diversi focolai emorragici e successivamente da un aumento del numero e delle dimensioni delle ghiandole con numerose figure mitotiche a carico delle cellule epiteliali ghiandolari (Jones, 1997). Queste ultime vanno incontro ad una intensa proliferazione a cui si accompagna anche analogo fenomeno a carico della mucosa che, unitamente a quello delle ghiandole può determinare un aspetto adenomatoso-papillare della mucosa stessa. Inoltre è spesso associato un infiltrato infiammatorio che tende a scomparire man mano che le

ghiandole diventano cistiche e l'epitelio circostante si appiattisce (Marcato, 2002). Nella donna l'iperplasia dell'endometrio è considerata una forma precancerosa (Marcato, 2002), Reudrant et. al. nel 1987 hanno diviso le lesioni iperplastiche di più comune riscontro nella donna in 4 gruppi a seconda delle caratteristiche istologiche. Si tratta di alterazioni che è possibile riscontrare contemporaneamente nello stesso endometrio e che hanno mostrato atipie cellulari più o meno marcate ed una eziologia ormonale non necessariamente presente.

Tipo 1. iperplasia ghiandolare cistica diffusa.

Tipo 2. iperplasia adenomatoide con aspetti di adenoma.

Tipo 3. iperplasia ghiandolare con architettura atipica, forma intermedia tra un'iperplasia ed una neoplasia.

Tipo 4. iperplasia ghiandolare con atipie cellulari. Questo tipo di iperplasia può verificarsi nei tessuti che mostrano delle anomalie, ad esempio atrofia indotta dagli estrogeni e spesso coesiste con il tipo 1 (Reudrant et. al., 1987).

Nelle coniglie colpite da un carcinoma endometriale spesso le porzioni non neoplastiche mostrano aspetti di iperplasia, inoltre l'endometrio iperplastico mostra anche dei focolai di adenomiosi e di endometriosi. L'adenomiosi nella coniglia è stata descritta come una patologia caratterizzata da invaginamenti ghiandolari dell'endometrio all'interno del miometrio che colpisce in genere entrambe le corna uterine, concomitante alla piometra e all'iperplasia endometriale. Istologicamente le ghiandole si mostrano tortuose, irregolarmente dilatate, con un epitelio iperplastico. L'adenomiosi, il processo successivo rispetto all'endometriosi, consiste nella crescita delle ghiandole endometriali all'interno del miometrio e in posizione sottosierosa. I focolai ghiandolari presentano lumi rotondeggianti e allungati identici a quelli presenti nell'endometrio.

Istologicamente si osservano cisti costituite da cellule allargate, cuboidali, a palizzata, invadenti il miometrio. Le cellule stromali mostrano una disposizione disordinata oltre ad una localizzazione in distretti non propri, i nuclei sono allungati ed è presente una degenerazione ialina locale della matrice extracellulare in cui si trovano immerse (Meissner et. al., 1956).

7. ADENOCARCINOMA

Aspetto istologico

Dal punto di vista istologico l'adenocarcinoma della coniglia prende origine dalle porzioni più profonde delle ghiandole uterine mantenendo generalmente un pattern epiteliale ghiandolare ben visibile, con cellule di forma variabile disposte a formare acini irregolari, alcuni dei quali contenenti mucina, organizzati in lobuli multipli e accompagnati da stroma mixoide riccamente vascolarizzato (Baba e Von Haam, 1958; Sommerville, 1998; Weisbroth, 1964). Le strutture ghiandolari sono costituite da un epitelio monostratificato o più spesso pluristratificato con cellule cuboidali o colonnari, alcuni alveoli evidenziano una proliferazione atipica delle cellule che sono disposte in diversi strati concentrici. I lobuli appaiono di diverse dimensioni e sono immersi in un abbondante stroma, la maggior parte degli alveoli mantengono la membrana basale tranne nei punti in cui la proliferazione delle cellule è più attiva (Kurotaki et. al., 2007). Le cellule epiteliali della maggior parte degli acini nel caso osservato da Lansdow et. al. (1980) erano composte da un unico strato di cellule cuboidali con nuclei centrali e larghi, evidenti e numerose mitosi e cisti con cellule epiteliali appiattite.

Le cellule epiteliali neoplastiche osservati da Kurotaki et. al. (2007) in un adenocarcinoma uterino hanno mostrato variabilità di forma e dimensione e in alcuni punti apparivano fusi a creare un'unica massa sinciziale. Inoltre il tessuto le cellule neoplastiche in diversi punti mostravano un' invasione dello strato muscolare (Kurotaki et. al., 2007). I nidi e i cordoni di cellule epiteliali neoplastiche nel carcinoma descritto da Lansdown et. al. (1980) sono apparsi di grandi dimensioni ed immersi in un tessuto connettivo stromale e anche in questo caso si sono riscontrati cordoni di tessuto all'interno del miometrio (Lansdown et. al., 1980). L'indagine ultrastrutturale ha evidenziato una progressiva perdita della morfologia secretoria delle cellule con una perdita delle vescicole secretorie e delle ciglia (Baba e Von Haam, 1958). Nel carcinoma endometriale della donna, secondo quanto riportato da Elsinghorst et. al. (1984) lo stroma mostrava cellule mesenchimali, di aspetto schiumoso, contenenti muco e lipidi a livello del citoplasma e la cui presenza è associata ad un iperestrogenismo. La funzione di queste cellule non è ancora stata chiarita del tutto: potrebbero produrre o immagazzinare gli estrogeni e non è escluso che tali cellule giochino un ruolo nel metabolismo degli estrogeni o siano il bersaglio dei loro metaboliti. Nella coniglia un certo numero di tumori uterini hanno mostrato, a carico dello stroma, delle cellule di aspetto simile la cui presenza, analogamente a quanto dimostrato per la donna, conferma ulteriormente la relazione esistente tra il tumore endometriale e l'iperestrogenismo (Elsinghorst et. al., 1984).

Sintomatologia

Di solito, nelle prime fasi il tumore è asintomatico. I sintomi che insorgono per primi sono, nella maggior parte dei casi, una progressiva diminuzione della fertilità, aborti spontanei frequenti, riassorbimento fetale, pseudogavidanza, cisti mammarie e, molto frequentemente, ematuria (alla fine della minzione) o perdite vulvari siero-emorragiche (Croce, 2002; Greene, 1958; Ingalls et. al., 1964; Oran e Cutler, 1934; Sommerville, 1998). Secondo Hillyer (1994) la sintomatologia clinica della neoplasia e dell'iperplasia endometriale sarebbe la stessa e in aggiunta ai sintomi precedentemente elencati cita anche un aumento dell'aggressività e un sanguinamento molto imponente che in alcuni casi determina uno stato anemico del soggetto colpito (Hillyer, 1994). È possibile la comparsa anche di una sintomatologia più aspecifica: disturbi digestivi nelle femmine anziane, depressione, anoressia e dispnea nelle forme più avanzate nelle quali siano già presenti una carcinomatosi peritoneale diffusa o metastasi polmonari (Croce, 2002; Greene, 1958; Ingalls et. al., 1964; Oran e Cutler, 1934; Sommerville, 1998). La visita clinica può dare informazioni utili relative alla presenza di una neoplasia uterina solo se si tratta di una forma in stadio avanzato, in questo caso è infatti possibile rilevare la presenza di un utero ipertrofico alla palpazione dell'addome oppure di masse o noduli uterini delle dimensioni di almeno 1-5 cm di diametro nell'addome caudale. Tale reperto clinico non è però specifico di un adenocarcinoma ed è da mettere in diagnosi differenziale con altre condizioni nel corso delle quali l'utero può andare incontro a modificazioni simili: gravidanza, piometra o

emometra, aneurisma venoso, iperplasia endometriale ed altre neoplasie come il leiomiomasarcoma (Ingalls et. al., 1964).

Metastasi

Nell'adenocarcinoma le metastasi possono comparire anche dopo 1 o 2 anni dall'insorgenza del tumore (Brown, 2002), secondo Harkness et. al., (1995) il tempo che intercorre tra la diagnosi clinica e lo sviluppo delle metastasi è di circa 12 mesi. Nei casi descritti da Greene (1958) la comparsa di metastasi è stata osservata frequentemente nelle fasi più avanzate del tumore ed esse sono di solito associate ad una estesa necrosi del tumore primitivo e possono realizzarsi per via ematogena (fegato, polmoni, cervello, cute, osso) o per diffusione diretta (Brown, 2002; Croce, 2002; Quinton, 2003) al mesometrio e diffondere nella pelvi e in addome (peritoneo) dopo diversi mesi (Greene, 1958). Secondo Marcato (2002) l'adenocarcinoma è un tumore che metastatizza facilmente invadendo le vene e i linfatici e le metastasi compaiono innanzitutto a carico dei linfonodi iliaci e dei polmoni e successivamente a carico di milza, surrenali, tratto gastro-enterico, ovaie, reni e miocardio, spesso originando anche da tumori primitivi di piccole dimensioni (Marcato, 2002).

Diagnosi e trattamento

Un sospetto di adenocarcinoma uterino si può ottenere attraverso un esame citologico dello scolo vaginale (quando questo è presente), oppure attraverso la diagnostica per immagini. Una indagine radiografica permette però di evidenziare la presenza di

una massa solida, solo se di notevoli dimensioni, a carico dell'utero, organo che in condizioni normali non è possibile vedere, mentre un'ecografia dell'addome permette di stabilire le dimensioni della massa o di evidenziare la presenza ed il numero di eventuali noduli neoplastici (Murphy, 1997; Quinton, 2003). L'esame citologico eseguito sul liquido presente in addome, nell'occorrenza di ascite, può fornire informazioni utili riguardo alla presenza della neoplasia uterina (Sommerville, 1998). Una volta identificata la presenza di una massa uterina, il trattamento di elezione, per poter rimuovere con sicurezza tutto il tessuto neoplastico ed evitare recidive, è l'ovarioisterectomia (Murphy, 1997; Quinton, 2003). L'esame istologico della massa asportata (o di una eventuale biopsia) è l'unico mezzo diagnostico che consente di giungere ad una diagnosi definitiva di neoplasia uterina ed in particolare dell'istotipo. Secondo Croce (2002) l'ovarioisterectomia sembra sortire un buon effetto determinando un calo nei livelli ematici di estrogeni, responsabili dell'insorgenza del tumore, che rallentano la crescita delle eventuali metastasi. Solitamente, quando compare una sintomatologia clinica, la prognosi è infausta, poichè il carcinoma è già progredito fino all'invasione del miometrio, causando metastasi multiple peritoneali per via linfomatogena o diretta (Croce, 2002). Oltre all'ovarioisterectomia, è stata suggerita anche un'altra possibilità: l'ablazione dell'endometrio. Horowitz et. al. (2000), hanno valutato la possibilità di utilizzare tale tecnica per il trattamento, ma anche per la prevenzione, del tumore. Già in passato, altri autori, avevano indicato l'elettrocoagulazione, il laser, la distruzione fotodinamica ed altre tecniche, come possibili trattamenti di ablazione dell'endometrio. I risultati ottenuti dallo studio di Horowitz et. al. (2000), hanno però dimostrato che l'ablazione dell'endometrio non diminuisce

il rischio di carcinoma dell'utero (quindi ha scarso valore preventivo), inoltre può determinare anche un ritardo nella diagnosi, in caso di recidiva. Infatti, attraverso l'escissione dell'endometrio tramite utilizzo di elettrodi, vengono rimossi solo gli strati più superficiali e restano in sede le ghiandole degli strati più profondi, che possono proliferare e andare incontro a modificazioni neoplastiche. Inoltre attraverso questa tecnica, si forma spesso un'escara che impedisce o ritarda il sanguinamento vaginale, uno dei sintomi principali rilevabili in corso di neoplasia uterina (Horowitz et. al., 2000).

8. DECIDUOSARCOMA DELL'UTERO

Si tratta di una neoplasia mesenchimale estremamente rara. Cooper et. all. (2001) hanno segnalato un caso di deciduosarcoma ad insorgenza spontanea in una coniglia domestica di 6 anni mentre, Zook et. all. (1987) hanno condotto una sperimentazione sull'induzione di tale neoplasia tramite somministrazione di estrogeni e progesterone, utilizzando coniglie di 9 mesi d'età (Zook e coll., 1987). L'esistenza di un'unica segnalazione di deciduosarcoma ad insorgenza spontanea non permette di stabilire una relazione tra l'età dell'animale e l'incidenza della neoplasia. Il caso segnalato da Cooper et. al. (2006) riguarda una coniglia di razza tedesca. Zook et. al. (1987 e 2001) hanno invece condotto una sperimentazione utilizzando 23 coniglie di razza bianca neozelandese. Anche la razza quindi, come già riferito per l'età, non può essere oggettivamente considerato un fattore predisponente in funzione della scarsità di informazioni disponibili. Studi sperimentali condotti su questa neoplasia hanno evidenziato quanto sia gli

estrogeni che il progesterone rivestano un ruolo determinante (Zook et. al., 2001). Zook et. al. (1987 e 2001) per primi, hanno segnalato la comparsa di deciduosarcomi dell'utero, in un gruppo di conigli adulti di entrambi i sessi (femmine intere e maschi castrati), sottoposti a somministrazioni di estrogeni e progesterone esogeni. Dopo 14 giorni dalla sospensione del trattamento, le lesioni a carico dell'utero hanno mostrato regressione, mostrando quindi una stretta ormonodipendenza (Zook e coll., 1987; Zook e coll., 2001). Il ruolo degli ormoni, invece, non è stato dimostrato nel caso del deciduosarcoma spontaneo descritto da Cooper et. al. (2006). In quest'ultimo caso, nonostante lo stadio avanzato della neoplasia sono stati segnalati come unici sintomi alla visita clinica, solo anoressia ed infertilità. La palpazione dell'addome ha poi rivelato la presenza di una massa di circa 6 cm di diametro, occupante quasi completamente la cavità addominale (Cooper et. al., 2006). Cooper et. al. (2006) hanno descritto il deciduosarcoma uterino di una coniglia come una massa, che origina dallo stroma endometriale e che coinvolge anche il miometrio e il mesometrio, con un aspetto infiltrante. Le cellule erano organizzate in lamine e fasci disseminati tra cellule muscolari lisce oppure disposte concentricamente intorno a vasi ematici dilatati, a parete sottile. La neoplasia era costituita da due diverse tipologie di cellule: alcune più piccole, di aspetto fusato, con scarso citoplasma eosinofilo, nuclei centrali a forma di sigaro, cromatina in fini granuli e un singolo nucleolo non sempre evidenziabile. Più frequentemente le cellule apparivano di aspetto epitelioidi, con un citoplasma più o meno abbondante, vacuolizzato, debolmente eosinofilo, con grandi nuclei eccentrici e 1 o 2 nucleoli ben distinti. Si riscontravano comunemente cellule binucleate o multinucleate e frequenti cellule giganti con nuclei voluminosi,

di forma irregolare ed ipercromatici (Cooper et. al., 2006; Zook et al., 2001). Inoltre, accanto alla spiccata anisocitosi ed anisocariosi, vi erano numerose le mitosi (Zook et. al., 1987). Dal punto di vista ultrastrutturale, le cellule mostravano nuclei ipercromatici, rotondi o irregolari e spesso eccentrici, il citoplasma ricco di lipidi e glicogeno, i mitocondri numerosi e piccoli, la membrana cellulare con numerose interdigitazioni e addossata, nel versante interstiziale, a materiale extracellulare, PAS positivo alla microscopia ottica, simile ad una membrana basale (Zook et. al., 2001; Zook et. al., 1987). Ad oggi è un'eccezione il caso di deciduosarcoma con metastasi al polmone e al rene descritto da Zook et. al. (2001). Il deciduosarcoma, sebbene in altre specie (topo, ratto, cavia, uomo) non abbia ad oggi segnalazioni di capacità metastastica, nel coniglio vede tale fenomeno biologico come possibile, seppure con frequenza minore rispetto all'adenocarcinoma (Cooper et al., 2006).

9. LA MAMMELLA DELLA CONIGLIA

Conformazione anatomica

Le mammelle della coniglia sono 4-5 paia: 2 toraciche dette anche ascellari a causa della posizione poco lontana dalla punta della spalla, 1-2 addominali, 1 inguinale. Al di fuori dei periodi di lattazione i corpi mammari sono indistinguibili, durante la lattazione invece essi diventano molto voluminosi e le loro dimensioni aumentano procedendo in senso cranio-caudale con l'esclusione dell'ultimo paio che rimane il più piccolo. I linfatici delle due paia di mammelle toraciche e del primo paio addominale sono drenati dai linfonodi ascellari o direttamente oppure tramite i linfonodi ascellari accessori e quelli pettorali, invece i linfatici delle due paia addominali e del paio inguinale sono drenati dai linfonodi mammari (inguinali superficiali) in numero da 2 a 4 e sono situati dorsalmente alla mammella inguinale (Barone, 1994).

Aspetto istologico e controllo ormonale

Fino alla pubertà la mammella conserva un aspetto comparabile a quella del feto con lobuli di modeste dimensioni costituiti da condotti escretori e sprovvisti di alveoli, immersi in un tessuto connettivo molto abbondante. Con la pubertà il tessuto connettivo aumenta e si infiltra di adipociti, i lobuli si fanno voluminosi e sono costituiti prevalentemente da condotti il cui sviluppo arborizzato risente dell'azione degli estrogeni. Gli alveoli si formano più lentamente e il loro sviluppo completo si

verifica grazie all'azione sia degli estrogeni che del progesterone prodotti dall'ovaio nonché dalla prolattina e dall'ormone somatotropo sintetizzati dall'ipofisi. Inoltre gli ormoni corticosurrenali determinano l'inizio dell'attività funzionale della mammella a fine gravidanza. Durante l'allattamento i lobuli sono voluminosi e stipati gli uni con gli altri e l'epitelio degli alveoli cambia dimensioni a seconda dello stadio funzionale in cui essi si trovano. Il mantenimento della lattazione e dell'escrezione del latte vengono assicurati dall'ipotalamo e dall'ipofisi sotto l'influenza delle stimolazioni meccaniche della poppata. La secrezione è regolata in particolare dalla prolattina e dall'ormone somatotropo ipofisari, mentre l'ossitocina determina l'eiezione del latte agendo sui mioepiteliociti. Alla fine della lattazione la ghiandola mammaria regredisce e il latte non espulso resta nel lume degli alveoli che vengono distesi, l'epitelio si appiattisce finché il latte non viene riassorbito. Gli alveoli regrediscono o perdono il lume, alcuni scompaiono e il tessuto connettivo costituisce nuovamente la ghiandola che resta allo stato di riposo fino alla gravidanza successiva (Barone, 1994).

10. NEOPLASIE MAMMARIE DELLA CONIGLIA

Le neoplasie mammarie dei conigli d'allevamento (*Oryctolagus cuniculus*) sono state descritte da diversi autori e ci sono pareri discordanti circa la loro incidenza. Secondo Weisbroth (1974) si tratta di neoplasie frequenti nei conigli da laboratorio, Marcato (2002) invece le definisce come le patologie neoplastiche più frequenti che colpiscono il coniglio, Greene and Strausee (1949) ritengono l'adenocarcinoma mammario la neoplasia più

frequentemente riscontrata in questa specie dopo quello uterino, Heiman (1980) e Benirschke et. al. (1978) invece considerano rari tutti i tumori spontanei di questa specie e in particolare quelli mammari. Nel complesso le segnalazioni esistenti relative alle neoplasie mammarie dei conigli riguardano prevalentemente le forme maligne. Gli adenomi sono infatti poco segnalati come forme spontanee a sè stanti e sono più frequentemente descritti nell'ambito della patogenesi degli adenocarcinomi poichè, così come riportato da diverse fonti (Weisbroth, 1974, Greene 1939), nella maggior parte dei casi rappresentano una fase di transizione che precede l'insorgenza delle neoplasia maligna invasiva.

11. ADENOMI

Weisbroth nel 1974 ha segnalato 4 casi di neoplasia in conigli, appartenenti ad un gruppo di razza inglese, colpiti dalla stessa neoplasia mammaria che era stata classificata con il termine di adenoma. L'aspetto istologico della neoplasia era caratterizzato dalla presenza di voluminosi lobuli costituiti da acini ghiandolari numerosi e di piccole dimensioni con proliferazioni epiteliali. Tali acini apparivano separati da bande di tessuto fibroso e mostravano una disposizione disorganizzata. In alcune aree gli acini si mostravano distesi per la presenza al loro interno di materiale eosinofilo e occasionalmente uniti a formare delle strutture simili a cisti (Weisbroth, 1974). Nel 1987 Zudaïdy ha descritto un caso di neoplasia benigna ad insorgenza spontanea riscontrato in una coniglia, classificato come "cistadenoma papillare". Si osservava una pluristratificazione dell'epitelio degli alveoli, le cellule epiteliali mostravano occasionali figure mitotiche e una ipercromaticità nucleare, in alcuni punti le cellule

proliferate erano disposte a formare dei cordoni e non erano evidenti aspetti di invasività locale, la membrana basale era infatti intatta e non si osservavano metastasi all'interno dei vasi. Occasionalmente si riscontravano delle dilatazioni dei dotti galattofori (galattocele) (Zudaïdy, 1987).

12. ADENOCARCINOMI

Così come valutato per le forme uterine, anche per gli adenocarcinomi mammari i fattori predisponenti sono rappresentati dall'età, dalla razza e dalle stimolazioni ormonali.

Età

Il momento di maggiore incidenza dell'adenocarcinoma mammario è stato collocato da diversi autori tra il terzo e il quarto anno d'età. (Weisbroth, 1974, Greene, 1939, Zudaïdy, 1987).

Razza

Le razze più frequentemente colpite dalla neoplasia includono: belga, inglese del belgio, bianca neozelandese e incroci di bianca neozelandese (Heatley e Smith, 2004). Secondo Marcato (2002) si registra una incidenza meno elevata nelle coniglie di razza californiana e bianca neozelandese. Greene (1939) ha riportato diversi casi di neoplasia maligna e di carcinomatosi mammaria che si sono manifestati in due sole famiglie, belga e inglese, che

avevano mostrato un diverso decorso della malattia. Nonostante la popolazione dei soggetti esaminati non fosse molto ampia, gli studi effettuati da Greene (1939) hanno permesso di considerare la razza e le consanguineità tra i soggetti come importanti fattori implicati nell'insorgenza e nel decorso della patologia neoplastica (Greene, 1939).

Eziologia ormonale

L'eziologia ormonale di tali neoplasie nella coniglia è stata confermata da diversi autori e rappresenta un fattore comune anche per la donna e per altre specie come la cagna e la gatta (Jones, 1997, Heatley e Smith, 2004). Gli ormoni sessuali svolgono un ruolo cruciale nel controllo dell'attività funzionale della ghiandola mammaria ma rappresentano anche un fattore di rischio per l'insorgenza di eventuali neoplasie (Elling and Ungemach, 1983, Sartin et. al., 1992). Nella donna i fattori di rischio legati all'insorgenza della neoplasia mammaria comprendono fattori genetici e fattori ormonali (età del menarca e della prima gravidanza), nella cagna sono invece rappresentati dalle prolungate esposizioni al progesterone a causa di farmaci progestinici e dalla produzione del progesterone da parte del corpo luteo (Thuroczy et. al., 2007, Zeimet et. al., 1994, Nicholson et. al., 1991). Nella cagna inoltre gli ormoni sessuali agiscono sulla proliferazione cellulare nelle prime fasi di sviluppo del tumore mentre con la progressione di questo si verifica un calo dell'espressione dei recettori steroidei. Secondo Weisbroth (1974) l'adenocarcinoma mammario rappresenta una manifestazione locale di un disturbo sistemico, profondo, che coinvolge contemporaneamente tre organi con attività endocrina

quali le ghiandole surrenali, l'ipofisi e l'utero. Le alterazioni riscontrate a carico delle ghiandole surrenali e descritte dall'autore, includevano la presenza di numerose e piccole aree con cellule voluminose, con citoplasma chiaro, spesso vacuolizzate e con nuclei picnotici. L'ipofisi nei casi di preesistente mastopatia fibrocistica aveva mostrato un aumento di volume secondo l'autore da 3 a 5 volte maggiore delle normali dimensioni della ghiandola, determinato dall'iperplasia delle cellule cromofobe del lobo anteriore. Tale aumento di volume era inoltre proporzionale al grado di displasia del tessuto mammario. Weisbroth (1974) conclude che le alterazioni endocrine descritte, probabilmente causate dalle pseudogvidanze delle coniglie, allevate in gabbie poste vicino a quelle dei maschi, non simulano una sindrome di iperestrinismo, diversamente da quanto sostenuto da Greene (1939) e che a causa di ciò il ruolo degli estrogeni nella patogenesi delle neoplasie mammarie non è del tutto chiaro. Ha osservato infatti che nè le neoplasie mammarie, nè quelle uterine sono state indotte sperimentalmente simulando un iperestrinismo, a differenza delle forme spontanee (Weisbroth, 1974). Le due forme di neoplasia, mammarie e uterine, così come rilevato nella donna, possono coesistere spesso anche nella coniglia e la frequente associazione di questi due tipi di tumore conferma ulteriormente il coinvolgimento del sistema riproduttivo e l'eziologia ormonale comune di queste neoplasie (Greene, 1939). A conferma di ciò, venticinque casi di conigli colpiti da neoplasie mammarie osservati da Greene nel 1939, in sei casi presentavano anche una neoplasia dell'utero. Le alterate produzioni di ormoni, secondo Greene (1939) e così come affermato anche da Weisbroth (1974), in alcuni casi sono dovute ad anomalie che colpiscono altri organi, come le ghiandole surrenali, la tiroide e l'ipofisi (Greene, 1939). In particolare

negli animali colpiti da patologie mammarie le alterazioni ipofisarie sono quelle che si riscontrano più frequentemente (Pearce e Greene, 1940). Lipman et. al. (1994) hanno segnalato un caso di displasia mammaria associato ad un adenoma dell'ipofisi prolattino-secerne in una coniglia nullipara bianca neozelandese che aveva causato un aumento della prolattina circolante (Lipman et. al., 1994). La prolattina (LH) è un ormone, detto mammotropo, normalmente secreto dall'ipofisi che controlla la fisiologia della mammella e la secrezione del latte. In condizioni normali la sua produzione viene mediata dall'azione degli ormoni di origine ipotalamica, detti fattori di inibizione (Monesi, 1992). Secondo Lipman et. al. (1994) l'epitelio della mammella della coniglia è più sensibile agli alti livelli di prolattina circolante e all'azione lattogenica di questo ormone rispetto alla donna o ad altre specie come la topina. La causa di questa maggiore sensibilità del tessuto mammario è stata attribuita alla presenza di un maggior numero di recettori specifici a carico di esso. Nel caso descritto l'aumento della prolattina aveva determinato una iperplasia duttale e un aumento dell'attività secretiva ghiandolare nelle coniglie non gravide. I medesimi effetti erano stati osservati anche nei soggetti ipofisiectomizzati trattati con somministrazioni esogene di prolattina. Inoltre l'aumento degli estrogeni circolanti, che si verifica durante le ondate follicolari tipiche della coniglia, è stato considerato responsabile di una iperplasia e di una ipertrofia delle cellule acidofile dell'ipofisi, fino all'insorgenza di un adenoma. Gli estrogeni sono da considerarsi quindi responsabili secondariamente dell'insorgenza delle modificazioni a carico della mammella. (Lipmann et. al., 1994). Nel 2008 Sikoski et. al. hanno riferito un caso di iperplasia cistica e di adenocarcinoma mammario associato ad adenoma pituitario prolattino-secerne

in una coniglia nullipara di 4 anni, razza bianca neozelandese. Questo caso ha confermato quanto già noto riguardo all'azione della prolattina sul tessuto mammario, in particolare rispetto all'eziologia dell'iperplasia duttale e cistica e ha evidenziato come l'iperprolattinemia prolungata determini una proliferazione neoplastica maligna all'interno del tessuto mammario (Sikoski et. al., 2008).

Aspetto macroscopico

Heiman nel 1980 ha descritto un caso di carcinoma mammario in una coniglia come una massa di dimensioni di 20x8x3 cm estesa cranialmente fino alla clavicola e caudalmente oltre il margine sub-costale, lateralmente oltre l'ascella di destra e che ricopriva il torace sulla sinistra, oltre la linea mediana. Tale massa, di 340 gr di peso, si presentava calda alla palpazione, nodulare, mobile, , la cute sovrastante si presentava atrofica e aderente alla massa e dopo la rimozione di questa il tumore mostrava un colore grigiastro con presenza di aree emorragiche. All'interno della massa erano presenti numerose cisti di dimensioni da 1 a 10 cm di diametro, (Heiman, 1980). Greene (1939) ha descritto alcune forme di adenocarcinoma non associato a malattia cistica della mammella, considerandole poco comuni. Nelle fasi iniziali la neoplasia è descritta come singola, di piccole dimensioni, elastica e mobile e in genere unifocale senza interessare le mammelle adiacenti. In un secondo momento mostrava la comparsa di noduli aumentati di dimensioni con una progressione lenta ma graduale, che nella fase finale del processo, della durata complessiva variabile da 10 a 16 mesi, invadeva le strutture adiacenti (Greene, 1939).

13. MASTOPATIA FIBROCISTICA E ADENOCARCINOMA

Nella maggior parte dei casi la mastopatia fibrocistica è considerata come l'evento che precede l'insorgenza delle neoplasie, inizialmente delle forme benigne e in un secondo tempo degli adenocarcinomi (Heiman, 1980, Atherton et. al., 1999), Pearce et. al. nel 1979 hanno valutato che lo sviluppo del carcinoma mammario è spesso associato ad una mastopatia fibrocistica che insorge il secondo anno di vita nelle coniglie di allevamento. Secondo Marcato (2002) la maggior parte degli adenocarcinomi rappresentano la tappa finale di una progressione neoplastica della durata di 10-30 mesi con l'evoluzione di una mastopatia fibrocistica in papilloma intracistico e di questo in adenocarcinoma invasivo localmente e in alcuni casi metastatico. La carenza delle informazioni relative agli adenocarcinomi nelle coniglie d'allevamento è dovuta, nella maggior parte dei casi, al mancato approfondimento della diagnosi di quelle che appaiono come delle mastopatia fibrocistica ma che sono in realtà delle neoplasie (Marcato, 2002). Weisbroth (1974) ha riportato il caso di un gruppo di 19 coniglie di razza belga, consanguinee, che avevano mostrato delle alterazioni del tessuto mammario in un arco di tempo variabile dai 10 ai 29 mesi. L'età di insorgenza delle lesioni nei soggetti osservati, variava dai 10 ai 44 mesi ma era apparsa più frequente in femmine multipare di 2-3 anni. Le biopsie eseguite in tempi diversi sui tessuti patologici avevano mostrato una progressione delle lesioni. La prima alterazione del tessuto osservata era una mastopatia fibrocistica insorta secondariamente ad un periodo di intensa congestione mammaria, alterazioni che erano coincise con eventi ciclici irregolari. Le biopsie successive avevano mostrato inizialmente

delle strutture papillomatose e in un secondo momento una neoplasia maligna. La fase così detta “papillomatosa” era continuata per più di sei mesi prima che insorgesse l’adenocarcinoma, considerato da Weisbroth (1974) un esito inesorabile della patologia. A conferma della stretta connessione esistente tra la mastopatia fibrocistica e le neoplasie mammarie, Greene (1939) ha suddiviso i tumori mammari della coniglia in due gruppi: quelli preceduti dall’insorgenza di anomalie a carico del tessuto ghiandolare, in particolare dalla così detta “malattia cistica” e quelli che originano invece da tessuto mammario normale. Heiman (1980) ha descritto un caso di carcinoma mammario ad insorgenza spontanea in una coniglia di 6 anni a carico della prima mammella toracica di destra. Si trattava di un tumore complesso che, oltre alla neoplasia maligna, presentava diversi aspetti: tessuto mammario con, iperplasia da lattazione, fibro-adenoma, cistadenoma papillare.

14. MASTOPATIA FIBROCISTICA

Greene nel 1939 ha descritto la mastopatia fibrocistica, denominandola “malattia cistica”, come una condizione caratterizzata da improvvisi ed intensi ingorghi di secreto non infiammatorio e dalla formazione di cisti, che altri autori hanno segnalato anche come “mastite cistica” (Greene, 1939, Weisbroth, 1979). Si tratta di una patologia ad eziologia ormonale poichè causata dall’accumulo degli estrogeni prodotti in corso di pseudogavidanza e dall’azione di quelli derivanti dal complesso ipofisi-surrene e da svariati autori è stata considerata una lesione preneoplastica (Hughes et. al., 1981, Atherton et. al., 1999). Atherton et. al., (1999) hanno riportato un caso di

mastopatia fibrocistica non infettiva descrivendolo come una condizione che compare occasionalmente nelle coniglie femmine di razza pura o mista, caratterizzata da periodi di intensa congestione mammaria, legati ad irregolarità nei cicli estrali. Si trattava di una coniglia bianca neozelandese di 5 anni e 4 Kg di peso che presentava dei noduli sottocutanei di diverse dimensioni, i capezzoli anteriori erano visibilmente aumentati di volume, di colore rosato e alla compressione gemevano materiale sieroso giallognolo d'aspetto simile a colostro di vacca. (Atherton et. al., 1999). Nei casi osservati e descritti da Greene (1939) la malattia cistica aveva mostrato un andamento estremamente irregolare e dalla comparsa delle prime cisti alla morte dell'animale per carcinomatosi, a seconda dei casi, erano trascorsi da 7 a 25 mesi. Tale patologia era infatti insorta in alcuni casi improvvisamente, coinvolgendo tutto il sistema mammario, mentre in altri aveva interessato solo un distretto del tessuto mammario. Le lesioni in alcuni casi si erano risolte completamente nel giro di alcuni giorni riportando il tessuto alla normalità, mentre in altri il fenomeno aveva alternato fasi di completa regressione a riacutizzazioni (Greene, 1939). Diversi autori hanno concordato nel suggerire l'ovarioisterectomia come un utile mezzo preventivo nell'insorgenza di una eventuale neoplasia. Hughes et. al. nel 1981 hanno infatti segnalato un caso di una coniglia di 1 anno e mezzo, incrocio tra una gigante californiana e una bianca neozelandese, che inizialmente aveva mostrato due noduli sottocutanei a carico di due ghiandole mammarie, asportati in corso di ovarioisterectomia. Dopo 9 giorni dall'intervento erano comparsi degli altri noduli a carico di 3 ghiandole mammarie che erano però regrediti definitivamente nel giro di un mese (Hughes et. al., 1981). Nel caso osservato da Atherton et. al. (1999) le lesioni causate dalla mastopatia

fibrocistica, noduli del parenchima mammario e cisti dei capezzoli, si erano completamente risolte nell'arco di un mese circa dall'intervento di castrazione, senza progressione della patologia nè comparsa di recidive nell'arco dei successivi due anni (Atherton et. al., 1999).

Aspetto istologico

L'aspetto istologico della mastopatia fibrocistica osservata da Weisbroth (1974) ha mostrato una origine delle cisti dagli acini e dai dotti ghiandolari dilatati. Con la progressione della malattia tali cisti sono apparse unite fino alla completa fusione e alla formazione di strutture multiple. Attorno alle cisti e agli acini ghiandolari dilatati era evidente una abbondante quantità di tessuto connettivo fibroso. L'epitelio delle cisti nella maggior parte dei casi è apparso appiattito oppure le cellule epiteliali proliferate formavano strutture sessili o peduncolate, che nella fase finale del processo proliferativo sviluppano un abbondante asse stromale. I papillomi andavano rapidamente incontro ad una crescita ramificata, le branche di queste strutture si unite univano inoltre tra loro delimitando degli spazi circondati da cellule epiteliali che formavano strutture simili ad acini. In questa fase i papillomi non mostravano un carattere invasivo, le cellule epiteliali acquistano solo in un secondo tempo caratteri di malignità (Weisbroth, 1974, Greene, 1939).

15. ADENOCARCINOMA DELLA MAMMELLA

Aspetto istologico

Istologicamente gli adenocarcinomi mammari mostrano un pattern tubulare e tubulo-papillare. Sono costituiti da diversi alveoli alcuni dei quali formati da un singolo strato di cellule epiteliali cuboidali con aspetto analogo a quello della mammella normale, immersi in una matrice di tessuto connettivo denso. Altri alveoli mostrano invece un epitelio pluristratificato le cui cellule presentano un'intensa attività proliferativa. All'interno di alcuni lobuli sono presenti delle proiezioni papillari e nei lumi degli alveoli sono presenti gruppi di cellule neoplastiche libere. Le cellule dello strato interno dell'epitelio ghiandolare proliferato sono di forma cubica o rotondeggiante, di dimensioni aumentate, con nuclei rotondi o ovali e numerose figure mitotiche. (Polson, 1927). Heimann (1980) ha descritto un adenocarcinoma mammario ad insorgenza spontanea come una neoplasia incapsulata, con setti che dalla periferia si dirigevano verso il centro andando a costituire lobi e lobuli. Le ghiandole mostravano diverse forme: tubulari semplici, sacciformi e ramificate, costituite da cellule epiteliali voluminose. All'interno della massa erano inoltre presenti vaste aree di necrosi e molte cisti che mostravano proiezioni papillari occludenti il lume e una reazione infiammatoria accerchiante. Alcune cellule epiteliali delle papille presentavano aspetti di attività funzionale a causa della presenza di globuli di lipidi nel citoplasma, normalmente presenti nella mammella durante la gravidanza o la lattazione. Nelle porzioni carcinomatose erano inoltre presenti cellule

giganti e figure mitotiche e nei vasi frequentemente emboli neoplastici. (Heimann, 1980). La neoplasia mammaria descritta da Kauffman et. al. (1971) ha mostrato un pattern epiteliale con cellule marcatamente iperplastiche alcune delle quali, così come descritto anche da altri autori, organizzate in strutture papillari convolute, con nuclei grandi e vescicolosi, frequenti figure mitotiche ed una moderata quantità di citoplasma basofilo. Nei casi osservati da Meissner et. al., (1956) i dotti e gli acini all'interno della neoplasia apparivano enormemente proliferati simulando quella che nella donna viene definita una mastite cronica cistica. Nei casi osservati da Weisbroth (1974) si osservavano una pluristratificazione dell'epitelio, irregolarità di forma e di dimensioni delle cellule, aumento dell'ipercromaticità del nucleo e frequenti figure mitotiche. Queste atipie erano presenti all'interno di tessuti mammari che erano stati colpiti precedentemente da una mastopatia fibrocistica. Nella fase finale il carcinoma assumeva un carattere invasivo, infiltrando il muscolo sottostante e il tessuto connettivo perighiandolare (Weisbroth, 1974). Sikoski et al. (2008) hanno osservato una neoformazione di una coniglia bianca neozelandese di 4 anni, che istologicamente mostrava iperplasia e displasia mammaria associate ad un adenocarcinoma. Erano evidenti dei lobuli iperplastici densamente cellulari con cordoni ed aggregati irregolari di cellule epiteliali neoplastiche che formavano strutture tubulari separate da un denso stroma fibro-vascolare. Le cellule neoplastiche presentavano una forma da cuboidale a poligonale, con citoplasma finemente granulare, basofilo, nuclei centrali con cromatina dispersa e un solo nucleolo. Le mitosi presenti erano da 1 a 5 per campo e si evidenziavano emboli neoplastici all'interno de vasi linfatici (Sikoski et al., 2008). Greene (1939) ha descritto quattro casi di adenocarcinomi non

associati ad una patologia preesistente (mastite cistica) che avevano mostrato un decorso clinico di circa 10 settimane. Durante le prime fasi di sviluppo le quattro neoplasie hanno mostrato un aspetto simile con numerosi, piccoli acini ghiandolari separati da bande di tessuto fibroso all'interno di ampi lobuli. Con la progressione della patologia gli acini apparivano molto dilatati con la presenza di cellule epiteliali desquamate all'interno del lume. L'epitelio degli acini mostrava una intensa attività proliferativa. La maggior parte delle cellule si presentavano vacuolizzate con i margini indistinti, si osservavano frequenti figure mitotiche ma non era evidente alcuna invasività da parte del tessuto neoplastico. Uno dei quattro casi descritti da Greene (1939) è stato osservato in due momenti diversi, fino a poco tempo prima della morte del soggetto per carcinomatosi. Inizialmente la massa era costituita da un unico nodulo ben circoscritto che istologicamente mostrava una struttura di tipo acinoso. L'epitelio appariva più alto del normale e i lumi meno distinti, le figure mitotiche erano numerose. Nell'arco di 10 mesi la neoplasia era aumentata di dimensioni senza mostrare alcun cambiamento nell'aspetto istologico ad eccezione di un incremento del numero delle figure mitotiche. Inoltre in questo stesso periodo è comparso un secondo nodulo localizzato dalla parte opposta al primo, che nel giro di due mesi ha raggiunto una dimensione doppia rispetto all'altro. Istologicamente la struttura di questo tumore è apparsa radicalmente differente da quella del tumore primario con una perdita completa dell'organizzazione. Si evidenziavano formazioni acinose e cellule epiteliali organizzate in strutture a crescita solida, masse e cordoni irregolari infiltranti il tessuto connettivo in tutte le direzioni. Inoltre verso la fase finale della progressione neoplastica il tessuto ha mostrato un coinvolgimento anche della cute e del

muscolo adiacenti e la presenza anche di altri noduli isolati nel tessuto circostante (Greene, 1939).

Metastasi

I casi di adenocarcinomi mammari segnalati nel corso degli anni hanno segnalato la presenza di metastasi a carico di diversi organi come i polmoni e i linfonodi regionali. (Weisbroth, 1974). In un caso descritto da Greene (1939) il carcinoma mammario ad insorgenza spontanea, non correlato allo sviluppo di altre patologie mammarie, aveva dato origine a delle metastasi a carico di linfonodi ascellari, inguinali, mesenterici e mediastinici nonché a carico di organi addominali (fegato, milza, rene, surrenali, ovaie, cervice ,vagina), polmoni e diaframma, che mostravano aspetto istologico analogo a quello del tumore primitivo (Greene, 1939).

Trattamento e diagnosi

La diagnosi delle neoplasie mammarie nella coniglia può avvenire attraverso un esame clinico e la palpazione delle neoformazioni mammarie. Sia in caso di neoplasie benigne che maligne si rilevano noduli sottocutanei di dimensioni irregolari, raramente dolorosi, fluttuanti, dai quali eventualmente può fuoriuscire latte o siero o liquido giallastro dal capezzolo se coinvolto. Gli adenocarcinomi mammari possono mostrare ulcerazioni. L'accertamento della malignità può avvenire solo mediante esame citologico o esame bioptico (Hillyer, 1997). Il trattamento di elezione in caso di neoformazioni mammarie, sia

che si tratti di neoplasie benigne che maligne, è la rimozione chirurgica mediante mastectomia parziale o completa a seconda del numero di noduli e dalla sede. Per prevenire eventuali recidive è indicata l'ovarioisterectomia che può essere eseguita sede contestualmente alla mastectomia. In caso di adenocarcinomi è opportuno eseguire prima la castrazione e poi la rimozione della neoplasia mammaria per evitare di contaminare, nel corso dell'intervento la cavità addominale con cellule tumorali. L'ovarioisterectomia è indicata anche nel trattamento delle mastopatie fibrocistiche poichè determina la risoluzione dei segni clinici nell'arco di 3-4 settimane e previene l'insorgenza di tumori (Atherton et. al., 1999). Hughes et. al., (1981) suggeriscono inoltre l'ovarioisterectomia come trattamento per prevenire sia l'insorgenza che la progressione della neoplasia mammaria.

CONTRIBUTO SPERIMENTALE

1. NEOPLASIE DELL'UTERO

Le neoplasie uterine rappresentano le forme neoplastiche più comunemente riscontrate nei conigli d'allevamento (*Oryctolagus Cuniculus*) (Brown, 2000) ed in particolare gli adenocarcinomi mostrano una maggior frequenza rispetto alle forme benigne (Weisbroth, 1974). L'incidenza di queste neoplasie aumenta con l'età e può raggiungere il 60% nei soggetti di età compresa tra i tre e i quattro anni (Brown, 2000). Gli estrogeni e il progesterone svolgono un ruolo fondamentale nel controllo dell'attività endometriale e nell'insorgenza della neoplasia. I conigli sono infatti una specie ad ovulazione indotta e la pseudogavidanza rappresenta una condizione comunemente riscontrata nei soggetti adulti, caratterizzata da un mantenimento prolungato del corpo luteo e dalla produzione di progesterone in assenza di concepimento (Knobil, 1998). La stretta associazione tra l'insorgenza della neoplasia endometriale e l'influenza degli ormoni steroidei è stata dimostrata nella donna e l'espressione dei recettori steroidei nelle cellule neoplastiche è considerata un fattore prognostico che può essere utilizzato per stabilire una appropriata terapia ormonale (Shabani et. al., 2007). Il contributo sperimentale di questo lavoro è consistito nel reperire tessuti uterini neoplastici di conigli domestici su cui è stato applicato un pannello immunohistochimico che ha avuto la finalità di valutare l'importanza di alcune variabili biologiche (attività proliferativa, ormonosensibilità, istogenesi, espressione della telomerasi) con due finalità principali: 1) dimostrare il ruolo e l'importanza del fenomeno nel modello studiato; 2) poiché le variabili studiate

sono da ritenersi validi fattori prognostici nei tumori in generale e nel modello umano di neoplasia in particolare, fornire dati di confronto tra i modelli.

2. MATERIALI E METODI

Il materiale reperito e oggetto di studio è rappresentato da diciassette tessuti uterini di coniglie domestiche. Dodici campioni di utero, già fissati in formalina, sono pervenuti presso il dipartimento servizio di prova di Anatomia Patologica del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale dagli ambulatori di veterinari liberi professionisti del territorio di utenza che hanno eseguito sulle coniglie domestiche interventi di ovarioisterectomia in via preventiva o in seguito al riscontro clinico ed ecografico di anomalie uterine. Questi campioni sono stati successivamente inclusi in paraffina. I restanti 5 casi sono invece pervenuti, come materiale già incluso in paraffina, dal laboratorio privato d'analisi veterinarie "San Marco" di Padova. Tutte le sezioni ottenute dai campioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina per l'interpretazione istologica.

Immunoistochimica

Sulla casistica dei tumori uterini raccolti è stato applicato un pannello di anticorpi per valutare l'ormonosensibilità attraverso l'espressione dei recettori per il progesterone (anticorpo anti-PR), l'istogenesi della neoplasia dall'epitelio ghiandolare o luminale (anticorpo anti-CK19) e l'indice di attività proliferativa

(anticorpo MIB-1) e telomerasica. La valutazione dei recettori per il progesterone è stata condotta sulla base della percentuale di cellule che mostravano positività nucleare (cut-off del 10%). L'indice di attività proliferativa è stato valutato attraverso una analisi semiquantitativa sulla base della percentuale di positività nucleare stimata come scarsa, moderata o intensa (rispettivamente 1-25%, 26-50%, 51-100%). La correlazione dell'età tra le neoplasie benigne e quelle maligne è stata condotta attraverso il test T di Student mentre il test di esatto di Fisher è stato utilizzato per mettere in relazione la malignità con l'espressione della positività all'anticorpo MIB-1 o ai recettori del progesterone. Il test di Pearson è stato utilizzato per valutare la correlazione tra la positività all'anticorpo MIB-1 e quella per i recettori del progesterone.

Metodica

Su vetrini precedentemente trattati con resina epossidica a due componenti per favorire l'adesione delle sezioni, sono state raccolte due sezioni istologiche per vetrino, dello spessore di 4 micron, per un numero di vetrini pari al numero di anticorpi impiegati. In ogni vetrino una sezione è stata trattata con l'anticorpo specifico mentre l'altra è stata utilizzata come controllo negativo.

- I vetrini sono stati messi in termostato per 10' a 37°C per favorire meglio l'adesione delle sezioni.
- Sparaffinatura in Solvent Plus 2 passaggi ciascuno di 15'.
- Idratazione in una serie di soluzioni di alcool etilico a concentrazione decrescente (100%, 95%, 80%, 50%)

- Inibizione delle perossidasi endogene: immersione dei vetrini in una soluzione di 170 ml di acqua distillata e 1,5 ml di H₂O₂ al 0,3% per 30'.
- Riesposizione dei siti antigenici: preparazione del tampone citrato con 0,525 gr di acido citrico in 250 ml di acqua distillata portato a pH 6 con NaOH. Immersione dei vetrini nel tampone e passaggio nel microonde a 750 W 1 ciclo per 5' (CAD-E), 2 cicli per 5' (CK-19 e Telomerasi), 4 cicli per 5' (Mib-1), 1 ciclo per 5' a 750 W e 3 cicli per 5' a 650 W (PR), rabboccando il tampone tra un ciclo e l'altro.
- Raffreddamento dei vetrini sotto cappa per 20'.
- Lavaggio con acqua per 5' e con TRIS-USO per 5'.
- Anticorpo primario: aggiunta dell'anticorpo opportunamente diluito con tampone PBS solo sulle sezioni campione (le diluizioni a cui sono stati sottoposti gli anticorpi sono riportati in tabella 1), mentre su quelle di controllo aggiunta solo del tampone PBS.
- Incubazione: tutti gli anticorpi a +4°C per una notte. Solo il PR a 37°C per 90'.
- Anticorpo secondario o ponte rappresentato da un anticorpo policlonale biotinato di capra anti-immunoglobuline di topo mouse, posto per 15' a T° ambiente.
- Lavaggio con Tris-uso, 3 passaggi di 5' e asciugatura.
- Anticorpo terziario. Complesso rivelatore, rappresentato da streptavidina-perossidata (STREPTAVIDIN/HRP) applicato sulle sezioni per 30' a T° ambiente.
- Lavaggio con Tris-uso: 2 passaggi di 5' e asciugatura dei vetrini.
- Cromogeno: DAB (Diaminobenzidina), T° ambiente per 10'
- Lavaggio con Tris-uso per 3'
- Lavaggio con acqua per 3'

- Ematossilina di Papanicolau: diluizione in soluzione acquosa (1:2) e immersione dei vetrini per 3'.
- Lavaggio in acqua
- Disidratazione in una serie di soluzioni di alcool etilico a concentrazione crescente (50%, 80%, 95%, 100%)
- Chiarificazione: 2 passaggi in SOLVENT-PLUS per 3'.
- Montaggio con DPX

3. RISULTATI

Sul totale dei 17 campioni di utero processati è stata formulata una diagnosi di adenoma in 4 casi, di adenocarcinoma in 6 casi, di leiomioma in un caso e nei restanti 6 casi non sono state rilevate alterazioni neoplastiche bensì forme di endometriosi cistica (6 casi) in un caso associato a poliposi endometriale e in un altro apiometra. Le valutazioni di seguito riportate effettuate hanno riguardato solo gli adenomi e gli adenocarcinomi. L'età dei soggetti in esame variava dai 2 agli 8 anni senza particolari differenze tra gli adenomi e gli adenocarcinomi ($p > 0.05$). In particolare nei 5 casi di adenomi osservati l'età media di insorgenza era di 4,25 anni mentre nei 6 casi di carcinomi l'età media era di 5,2 anni. Non sono pervenute informazioni relative alla razza degli animali.

ASPETTO ISTOLOGICO

Adenomi

Le neoplasie mostravano una dimensione macroscopica che si aggirava dai 2 ai 6-7 cm di diametro. Istologicamente era

visibile, in un caso, una capsula connettivale che circondava il tessuto neoplastico. Quest'ultimo era costituito in tutti i casi da cellule epiteliali organizzate a formare strutture tubulari e proiezioni papillari supportate da una moderata quantità di stroma fibroso più o meno lasso, riccamente vascolarizzato. Le cellule epiteliali erano di forma poligonale, di 20-25 μm di diametro con basso rapporto nucleo-citoplasma, margini cellulari ben evidenti, abbondante citoplasma eosinofilo, nuclei voluminosi in posizione basale o centrale con cromatina finemente dispersa e nucleoli prominenti. Anisocitosi e anisocariosi lievi. Non erano visibili figure mitotiche se non in rari casi.

Adenocarcinomi

Le dimensioni delle neoformazioni si aggiravano da 1 a 5 cm di diametro. All'istologia il tessuto neoplastico appariva originare dalle ghiandole uterine localizzate nell'endometrio con infiltrazione del miometrio e assenza di capsula connettivale delimitante. Le cellule epiteliali neoplastiche, voluminose e di forma poligonale erano organizzate a formare strutture tubulari e papillari supportate da un abbondante stroma fibroso (Foto n. 2). In diversi punti delle sezioni erano evidenti focolai di cellule a crescita solida organizzate in cordoni o nidi. I margini cellulari erano sempre ben visibili, il citoplasma si presentava abbondante ed eosinofilo, in alcuni casi vacuolizzato, i nuclei avevano forma tonda-ovale, posizione centrale e la cromatina era organizzata in zolle, in granuli o mostrava aspetto vescicolare. Erano in genere evidenti singoli nucleoli e rare mitosi. In due casi vi erano numerosi spazi cistici rivestiti da epitelio neoplastico e ripieni di

materiale eosinofilo omogeneo o granulare e occasionali ampie aree di necrosi ed emorragia.

IMMUNOISTOCHIMICA

Adenomi

Le indagini immunoistochimiche hanno evidenziato in tutti i casi una positività ai recettori per il progesterone ed una negatività alla CK19. Due casi su quattro hanno mostrato una positività nucleare al MIB-1 minore del 25% e i restanti 2 casi una positività tra il 25 e il 50%. Due casi su quattro hanno mostrato una positività nucleare alla telomerasi.

Adenocarcinomi

Quattro casi su sei hanno mostrato una positività ai recettori per il progesterone e cinque su sei una positività alla CK19 da moderata ad intensa. Tutti i casi erano negativi alla telomerasi. Cinque casi su sei hanno mostrato una positività nucleare all'anticorpo Ki-67 (clone-Mib-1) minore del 25% e il caso restante una positività tra il 25 e il 50% .

	<i>PR</i>	<i>CK 19</i>	<i>TEL.</i>	<i>Mib-1</i>
<i>Adenomi</i>	-	+	+	
<i>n. 1</i>	+	-	-	< 25%
<i>n. 2</i>	+	-	+	25-50%
<i>n. 3</i>	+	-	+	< 25%
<i>n. 4</i>	+	-	-	25-50%
<i>Adenocarci nomi</i>				
<i>n. 1</i>	+	+	-	< 25%
<i>n. 2</i>	-	+	-	< 25%
<i>n. 3</i>	+	+	-	25-50%
<i>n. 4</i>	+	+	-	< 25%
<i>n. 5</i>	+	+	-	< 25%
<i>n. 6</i>	-	-	-	< 25%

4. DISCUSSIONE

L'utero della coniglia, a differenza di quanto si registra in altre specie di mammiferi domestici, rappresenta una sede frequente di neoplasia. I tumori di possibile insorgenza sono diversi, sia di natura epiteliale che mesenchimale, benigni e maligni. L'adenocarcinoma uterino, così come osservato da diversi autori, rappresenta la neoplasia più comunemente riscontrata in questa specie (Harkness e Wagner, 1995) la cui insorgenza è legata a svariati fattori come l'età, la razza e l'azione degli ormoni sessuali (estrogeni e progesterone). Gli adenomi rappresentano invece una forma neoplastica meno frequente (Marcato, 2002).

Sulla casistica in esame le valutazioni effettuate hanno riguardato sia gli adenomi che gli adenocarcinomi. L'età media di insorgenza della neoplasia sia per le forme benigne che per quelle maligne è risultata di poco superiore a quella riportata in letteratura (stimata tra i tre e i quattro anni. Brown, 2000) sia nel caso degli adenomi che degli adenocarcinomi (4,25 anni per gli adenomi e 5,2 anni per gli adenocarcinomi). I campioni pervenuti appartenevano in tutti i casi a coniglie domestiche delle quali però non è stata specificata la razza e non è stato quindi possibile identificare una predisposizione relativamente a questo fattore. L'aspetto istologico delle neoplasie ha mostrato un pattern prevalentemente tubulare e tubulo-papillare sia negli adenomi che negli adenocarcinomi, inoltre in tutti i casi di adenocarcinomi era evidente un'invasione del miometrio da parte del tessuto neoplastico. Una ricerca recentemente condotta su 88 uteri di conigli tra normali, iperplastici e neoplastici ha rivelato il medesimo pattern istologico e un diverso grado di invasione del miometrio come già riportato in letteratura (Asakawa et. al, 2008, Greene e Newton, 1948). È noto che gli ormoni svolgono un ruolo predominante nell'ambito dello sviluppo delle lesioni proliferative patologiche dell'endometrio e nella donna con adenocarcinoma uterino è un dato accertato che la presenza e la quantità dei recettori steroidei è correlata con il grado di differenziazione istologica (Silverberg e Kurman, 1992). Gli adenocarcinomi ben differenziati esprimono fortemente i recettori per il progesterone mentre le forme scarsamente differenziate esprimono basse quantità di tali recettori (Mc Carty, 1979). Nella donna inoltre l'espressione dei recettori a carico delle cellule neoplastiche è considerato un importante fattore prognostico poichè i casi positivi spesso mostrano una buona risposta alla terapia ormonale (Symmers e Anderson, 1991).

Nella coniglia l'endometrio è continuamente sottoposto alla stimolazione ormonale da parte del progesterone che promuove la proliferazione neoplastica dell'epitelio. I risultati immunohistochimici hanno evidenziato un'espressione dei recettori per il progesterone simile sia negli adenomi che negli adenocarcinomi suggerendo che tali ormoni promuovono la trasformazione neoplastica senza però influenzare il comportamento della neoplasia (Asakawa et. al.). Anche Asakawa et. al. (2008) hanno rilevato che la prognosi dell'adenocarcinoma nella coniglia è indipendente dall'espressione dei recettori ormonali.

L'attività proliferativa valutata attraverso l'impiego dell'anticorpo Ki-67 (clone-Mib-1) ha permesso di rilevare in entrambe le forme, sia benigne che maligne, una proliferazione bassa poichè nella maggior parte dei casi questa è stata valutata con una quantità di nuclei positivi minore del 25%, da questo risultato si può concludere quindi che l'attività proliferativa non è correlata con la malignità della neoplasia.

La telomerasi, un complesso ribonucleoproteico che sintetizza un segmento di DNA telomerico all'estremità terminale dei cromosomi lineari, svolge un ruolo essenziale nell'immortalità cellulare e nell'oncogenesi. Alcuni tumori mostrano un incremento nell'attività telomerasica delle forme neoplastiche più avanzate (maligne) rispetto alle forme benigne (Chatziantonou, 2001). I carcinomi endometriali della donna sono positivi alla telomerasi e le forme con attività telomerasica maggiore possono risultare più aggressive rispetto a quelli che mostrano nessuna o scarsa attività (Ebina et. al., 1999). I risultati di questa ricerca mostrano una positività della telomerasi in due soli casi di adenomi, in cui la positività riscontrata (nucleare) correla con la valutazione di attività dell'enzima (Panarese et. al., 2006). La

negatività degli adenocarcinomi, unitamente all'espressione immunohistochimica non indicativa in 2 su 4 adenomi, non supporta un ruolo fattivo della telomerasi nella biologia delle neoplasie uterine della coniglia.

Le citocheratine sono proteine del citoscheletro che costituiscono filamenti intermedi all'interno delle cellule epiteliali, in particolare la CK19 rappresenta un marker di differenziazione ghiandolare (Ivanyi et. al., 1993). La positività alla CK19 rilevata in quasi tutti i casi di adenocarcinomi suggerisce per questi ultimi un'origine dalle ghiandole uterine mentre la totale negatività degli adenomi indica piuttosto un'origine dalle cellule dell'epitelio luminale.

Alla luce dei risultati immunohistochimici ottenuti è possibile valutare che l'ormonosensibilità può essere utilizzata come parametro per stabilire una appropriata terapia anti-tumorale e nei casi osservati la terapia ormonale può essere considerata più appropriata di quella antiproliferativa tenendo conto della bassa attività proliferativa registrata nelle neoplasie. Inoltre, la bassa e versosimilmente non funzionale espressione della telomerasi negli adenomi e la assenza negli adenocarcinomi non supporta la tesi di una trasformazione maligna telomerasi-dipendente e quindi l'impiego di una approccio terapeutico anti-telomerasico.

CONTRIBUTO SPERIMENTALE

1. NEOPLASIE MAMMARIE

Le neoplasie mammarie della coniglia rappresentano la tappa finale di un processo di trasformazione del tessuto a partire da diverse lesioni preneoplastiche (mastopatia fibrocistica), fino all'insorgenza di adenomi e adenocarcinomi. In alcuni casi gli adenocarcinomi mammari si sviluppano insieme all'adenocarcinoma uterino. Gli ormoni sessuali svolgono un ruolo fondamentale nell'insorgenza della neoplasia e quindi la pseudogavidanza rappresenta, così come per le neoplasie endometriali, una condizione predisponente. Il presente lavoro si propone di condurre una valutazione delle neoplasie mammarie benigne e maligne dei conigli domestici sulla base dei campioni pervenuti presso il dipartimento negli ultimi tre anni. I criteri istologici ed immunoistochimici di questo studio sono gli stessi utilizzati nel corso della ricerca condotta sui tumori uterini, trattandosi anche in questo caso di tumori di natura epiteliale, ad eziologia ormonale. La castrazione in giovane età che negli ultimi anni viene condotta in misura preventiva sulle coniglie domestiche ha ridotto notevolmente anche l'incidenza dei tumori mammari, oltre che di quelli uterini e a causa di ciò la casistica a disposizione risulta esigua, in particolare quella relativa alle forme benigne che constano di un unico caso.

2. MATERIALI E METODI

Sei campioni di tessuto mammario sono pervenuti presso il nostro dipartimento rispettivamente da un ambulatorio privato della zona (4 casi), dal laboratorio di analisi veterinarie privato “San Marco” di Padova (1 caso) e dall’Istituto Zooprofilattico della Toscana e del Lazio (1 caso). I quattro campioni provenienti dall’ambulatorio sono stati prelevati in corso di interventi di mastectomia eseguiti su coniglie domestiche di razza non specificata e sono pervenuti presso la nostra sezione già fissati in formalina tamponata al 10% e successivamente inclusi in paraffina. I restanti due casi sono pervenuti in blocchetti già inclusi in paraffina. Su tutti i campioni sono state eseguite sezioni colorate con Ematossilina-Eosina per l’interpretazione istologica.

Immunoistochimica

Il pannello di anticorpi utilizzato per le indagini immunoistochimiche e la metodica applicata sono gli stessi e con le stesse finalità pianificate per i tumori uterini (MIB-1, CK 19, Telomerasi, recettori per il Progesterone) con in aggiunta l’espressione immunoistochimica per la Caderina-E (CAD-E). La metodica applicata sul pannello di anticorpi è la stessa riportata per le neoplasie uterine.

3. RISULTATI

I sei campioni di tessuto mammario sottoposti ad esame istopatologico hanno evidenziato in un caso la presenza di un adenoma e nei restanti cinque di un adenocarcinoma. L'età dei soggetti in esame era di 8 anni nel caso dell'adenoma mentre nei 5 casi di adenocarcinoma variava dai 3 agli 8 anni con una media di 5,4 anni. Non sono pervenute informazioni relative alla razza degli animali.

ISTOLOGIA

Adenoma

Istologicamente la neoplasia appariva delimitata da una capsula connettivale da cui originavano setti che davano al tumore un aspetto multilobulato. Le dimensioni stimate sulla sezione istologica erano di circa 2x1 cm e, all'esame con piccolo ingrandimento la neoplasia mostrava una elevata cellularità. Numerose cellule epiteliali monostratificate erano disposte a formare dei tubuli multifocalmente dilatati e contenenti abbondante materiale proteico amorfo (secreto eosinofilo). Le dilatazioni dei tubuli esitavano occasionalmente in formazioni cistiche con epitelio appiattito e tra i tubuli era evidente un moderato stroma di supporto vascolarizzato. Le cellule epiteliali erano poligonali, di 20-25 µm di diametro, con margini cellulari indistinti, abbondante citoplasma eosinofilo, lieve anisocitosi e anisocariosi, nucleo basale vescicoloso, cromatina dispersa e 1-2 nucleoli evidenti. Le mitosi riscontrate erano rare. Alla periferia

di questo erano evidenti diversi focolai di iperplasia duttale e lobuli di mammella in involuzione.

Adenocarcinoma

Un unico caso ha mostrato la presenza di una capsula connettivale intorno al tessuto neoplastico e la presenza di un'attività infiltrativa locale, la cellularità evidenziata in tutti i casi era alta con un pattern da tubulare o tubulo-papillare fino alla presenza di focolai tendenti alla configurazione solida accompagnate da moderato stroma fibroso di supporto, in un caso anche con aspetto edematoso. Le cellule epiteliali, disposte in uno strato singolo o doppio, mostravano forma rotondeggiante o poligonale, dimensioni di 20-25 μm di diametro, nuclei voluminosi in posizione centrale o basale e moderata anisocitosi e anisocariosi, citoplasma eosinofilo in quantità da moderata ad abbondante, mitosi da 1 a 5 per campo e presenza di eterofili in quantità da lieve a moderata. Alla periferia del tessuto neoplastico era registrabile la presenza di ectasia duttale e di alcuni lobuli di mammella in involuzione. In un caso le cellule hanno mostrato un'attività secretoria di tipo merocrino. All'interno dei lumi tubulari si evidenziavano cellule desquamate e in alcuni punti, sulla superficie delle cellule epiteliali, erano evidenti delle microvillosità. Nelle sezioni erano presenti inoltre vaste aree di necrosi, cellule in apoptosi, focolai di metaplasia squamosa e in un caso all'interno dei vasi linfatici erano evidenti emboli neoplastici. Alla periferia del tumore erano inoltre evidenti, in un caso, aggregati di linfociti.

IMMUNOISTOCHEMICA

Adenoma

L'unico caso di adenoma è risultato negativo ai recettori per il progesterone e alla Cad-E, positivo alla CK19, alla telomerasi e all'anticorpo Ki-67 (clone-Mib-1), in quest'ultimo caso con una positività nucleare minore del 25%.

Adenocarcinoma

Tre casi su cinque sono risultati positivi ai recettori per il progesterone (PR) con una positività nucleare da moderata ad intensa; due casi su cinque sono risultati positivi alla CK19; due casi su cinque positivi alla telomerasi; un caso su cinque positivo alla CAD-E con una positività citoplasmatica e cinque casi su cinque positivi al MIB-1 con una positività nucleare < del 25% in due casi, tra il 25 e il 50% in un caso e tra il 50 e il 75% nel caso rimanente.

	<i>PR</i>	<i>CK 19</i>	<i>TEL.</i>	<i>Mib-1</i>	<i>CAD-E</i>
Adenoma	-	+	+	< 25%	-
Adenocarcinomi					
<i>n. 1</i>	-	-	+	25-50%	-
<i>n. 2</i>	+	-	-	< 25%	-
<i>n. 3</i>	+	+	+	50-75%	-
<i>n. 4</i>	+	+	-	< 25%	+
<i>n. 5</i>	-	-	+	< 25%	-

DISCUSSIONE

Le neoplasie mammarie rappresentano forme comunemente riscontrabili nei conigli da laboratorio (*Oryctolagus Cuniculus*) in particolare gli adenocarcinomi, sebbene in merito alla loro incidenza esistano pareri discordanti (Greene and Strausee, 1949). É opinione comune che si tratti di neoplasie che insorgono secondariamente ad altre anomalie del tessuto mammario (mastopatia fibrocistica e papillomi intracistici) (Marcato, 2002) ma, seppure in misura ridotta, gli adenocarcinomi possono insorgere anche indipendentemente da lesioni preneoplastiche (Greene, 1939). L'eziologia ormonale delle neoplasie mammarie è un dato confermato, gli ormoni sessuali svolgono infatti un ruolo cruciale nel controllo dell'attività funzionale della mammella attraverso recettori specifici per gli estrogeni e per il progesterone. L'aumento delle concentrazioni ematiche di tali ormoni, che si verifica ad esempio in caso di ripetute pseudogvidanze nelle coniglie, è causa di una iperstimolazione di tali recettori e di una aumentata

attività proliferativa delle cellule epiteliali. La compresenza di neoplasie mammarie ed uterine negli stessi soggetti, che nella casistica a nostra disposizione è stata riscontrata in un solo caso, conferma quanto sostenuto relativamente all'eziologia ormonale comune di queste neoplasie. Disponendo di un unico caso di adenoma, è possibile infatti ragionare solo sui risultati ottenuti relativi agli adenocarcinomi. L'età media di insorgenza della neoplasia nei casi a nostra disposizione è risultata essere di 5,4 anni, superiore quindi a quella segnalata da numerosi autori (Weisbroth, 1974, Greene, 1939, Zudaidy, 1987). L'aspetto istologico osservato negli adenocarcinomi ha confermato quanto riportato in letteratura. Le neoplasie in esame hanno mostrato infatti in tutti i casi un pattern tubulare o tubulo-papillare e in un caso un aspetto infiltrante con presenza di emboli all'interno dei vasi, confermando ulteriormente quanto già noto rispetto a questi criteri di malignità. Il pannello di anticorpi applicato sulla casistica ha avuto lo scopo di valutare alcuni dei parametri già noti per analoghe neoplasie nella donna, nella cagna e nella gatta. Diversi studi documentano infatti l'importanza dell'utilizzo delle neoplasie spontanee della cagna come modello per lo studio, ad esempio, dei meccanismi di proliferazione e dell'ormonosensibilità nella carcinogenesi delle neoplasie di altre specie (Gerald et al., 2000). I parametri scelti come oggetto di indagine sono stati l'ormonosensibilità (anticorpi anti-recettore per il progesterone), l'attività proliferativa (anticorpo MIB1), l'istogenesi/differenziazione (anticorpi anti-citocheratina 19 e anti-caderina E), l'espressione della telomerasi (anticorpo anti-subunità catalitica).

Sulla base dei risultati ottenuti relativamente all'espressione degli anticorpi anti-recettore per il progesterone che sono stati espressi in quattro casi su cinque (con una positività da moderata ad

intensa) è possibile avvicinare il modello del coniglio a quello del cane e della donna nei quali il mantenimento della ormonosensibilità nel corso della differenziazione neoplastica è un dato noto e documentato da diversi autori. La prevalenza dei recettori per gli estrogeni e il progesterone è infatti all'incirca del 50% nelle neoplasie mammarie della cagna e tra il 60 e il 75% in quelle della donna (Sartin et. al., 1992). Nella gatta invece la perdita dell'espressione dei recettori ormonali si verifica nelle fasi iniziali di insorgenza della neoplasia diversamente dalle altre specie e questo potrebbe essere dovuto alla castrazione precoce delle femmine precedentemente all'insorgenza della patologia neoplastica (Rutteman et. al., 1991). L'enzima telomerasi è un complesso ribonucleoproteico che usa il proprio RNA come stampo per mediare la completa replicazione delle estremità cromosomiche, i telomeri, la cui lunghezza viene mantenuta dall'aggiunta di nucleotidi sequenze telomeriche. Il mantenimento di telomeri sufficientemente lunghi è un requisito per scavalcare i meccanismi di controllo della autolimitazione alla proliferazione cellulare, che le cellule neoplastiche si garantiscono grazie alla riespressione dell'enzima telomerasi, mantenuto invece non espresso nella maggior parte delle cellule somatiche. Su questo modello si fonda una probabile ipotesi di formazione della neoplasia, nonché di terapia anti-tumorale con strategie anti-telomerasi (Robbins e Cotran, 2005).

L'attività telomerasica rilevata nella casistica a nostra disposizione, presente in quattro casi su cinque, ha confermato i dati già noti relativi al comportamento di questo marcatore nei tessuti tumorali del cane e dell'uomo. Secondo una statistica effettuata nel 2004 le neoplasie del cane mostrano più del 95% di positività alla telomerasi mimando strettamente quanto noto in oncologia umana (Panarese, 2004, Argyle e Nasir, 2003).

L'attività proliferativa medio-alta riscontrata in tutti i casi osservati, ha confermato dati già noti in letteratura (Rutteman, 1990) relativi alle neoplasie mammarie della cagna e della donna nelle quali la differenziazione maligna è in genere accompagnata da un alto grado di attività proliferativa cellulare.

La Caderina-E, proteina di adesione intercellulare delle cellule epiteliali, che risulta sottoespressa durante la trasformazione maligna è l'acquisizione del fenotipo invasivo (Takeichi, 1991) è risultata positiva in un unico caso di adenocarcinoma che ha mostrato una positività intracitoplasmatica.

La positività alla citocheratina 19 (CK19), marker per gli epiteli ghiandolari, in due soli casi di adenocarcinoma è stata interpretata in due modi: come perdita della differenziazione cellulare, così come noto per le neoplasie mammarie della gatta (Ivanyi et. al., 1993).

Oppure come evidenza di un fenotipo non-luminal, come documentato nel modello umano, del cane e del gatto. Nella cagna infatti i carcinomi mammari, suddivisi in forme a fenotipo luminale e basale (luminal-like e basal-like), la CK19 è espressa solo nelle forme a pattern luminale (Sassi et. al., 2007).

Alla luce dei risultati ottenuti, nell'ambito del trattamento delle neoplasie mammarie il mantenimento dell'ormonosensibilità depone a favore dell'utilizzo di una terapia ormonale, così come valutato per le neoplasie uterine. Diversamente da queste, l'espressione della telomerasi in quasi tutti i casi e la presenza di una attività proliferativa medio-alta in tutti i casi indicano anche l'utilizzo di farmaci ad attività anti-telomerasica e anti-blastica come possibili terapie nel trattamento antitumorale di queste forme.

CONCLUSIONI

La casistica reperita per questa ricerca ha mostrato una quantità di neoplasie maligne, sia uterine che mammarie, superiore alle forme benigne. Nel complesso i tumori dell'utero sono risultati più numerosi rispetto a quelli della mammella.

Pur trattandosi di una casistica esigua questi dati confermano quanto già noto in letteratura relativamente ai tumori della coniglia ed in particolare alla maggior frequenza degli adenocarcinomi rispetto agli adenomi e alla maggior incidenza delle forme uterine rispetto a quelle mammarie.

I risultati ottenuti attraverso l'utilizzo del pannello immunohistochimico impiegato permettono di diversificare il modello di neoplasie uterine della coniglia da quelle della donna. L'ormonosensibilità risulta mantenuta con la progressione della malignità in entrambi i casi e nella donna viene persa solo nelle forme molto progredite. Gli altri parametri di malignità quali l'attività proliferativa e quella telomerasica hanno nel modello del coniglio scarsa rilevanza biologica, mentre sono fenomeni importanti nella progressione neoplastica dei carcinomi uterini della donna.

Le neoplasie della mammella possono essere invece considerate un modello intermedio tra quello della donna, della cagna e della gatta. L'attività proliferativa, quella telomerasica e l'ormonosensibilità vengono infatti mantenuti in tutti i casi ad eccezione della gatta che con la progressione maligna tende a perdere l'ormonosensibilità.

Sempre in base ai risultati ottenuti sulle caratteristiche biologiche di base, le possibili terapie nel trattamento antitumorale di queste forme sono di tipo anti-ormonale sia per i tumori uterini che per

quelli mammari, per questi ultimi è inoltre da considerare auspicabile anche l'utilizzo di farmaci ad attività anti-telomerasica e anti-blastica stante l'importanza che i relativi fenomeni biologici hanno rivelato con l'indagine immunohistochimica nella valutazione delle forme neoplastiche maligne.

ICONOGRAFIA

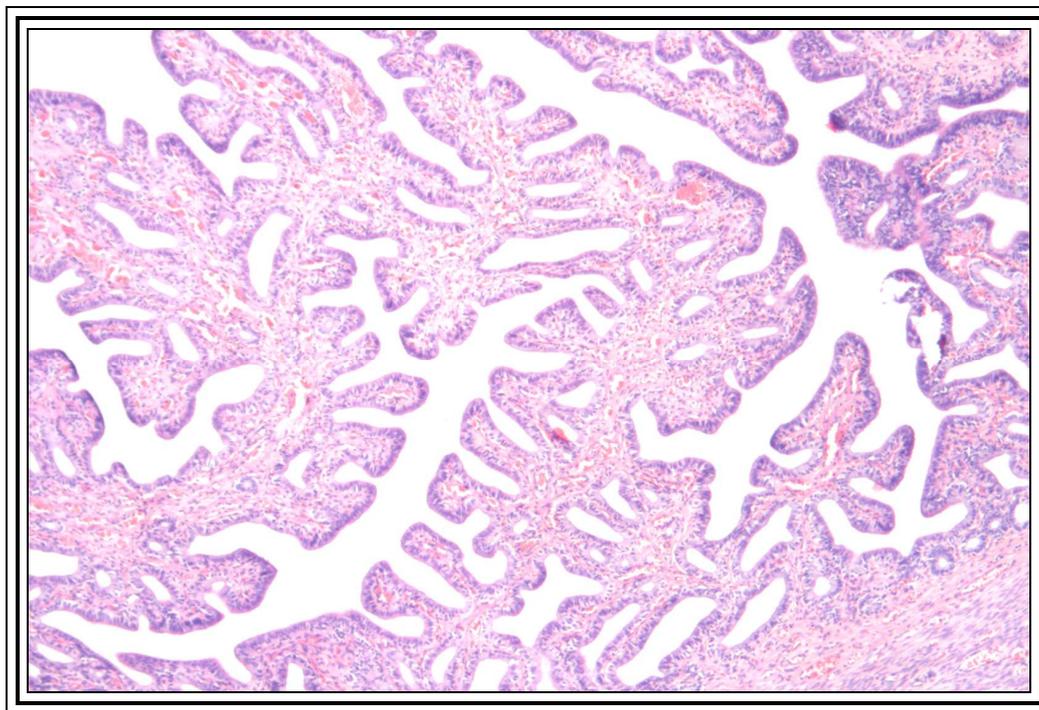


Foto n. 1: utero. Adenoma tubulo-papillare. Formazioni papillari di endometrio neoplastico sporgenti nel lume. EE. Ob. 5X

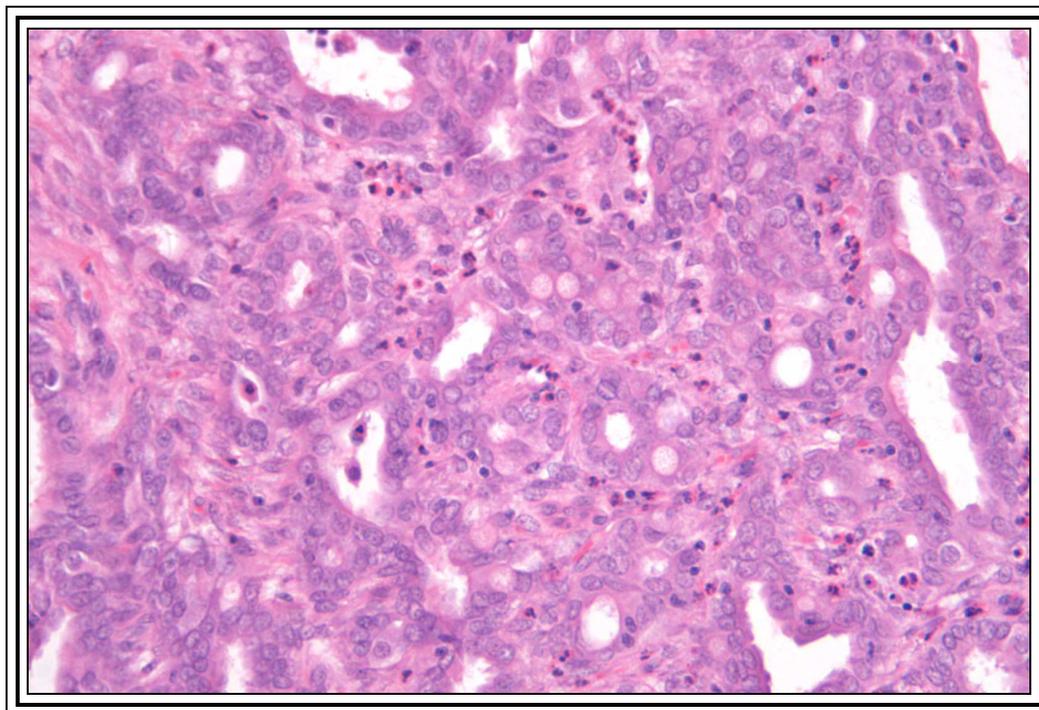


Foto n. 2: utero. Adenocarcinoma tubulo-papillare. Cellule neoplastiche organizzate a formare strutture tubulari irregolari supportate da stroma fibroso. EE. Ob. 5X

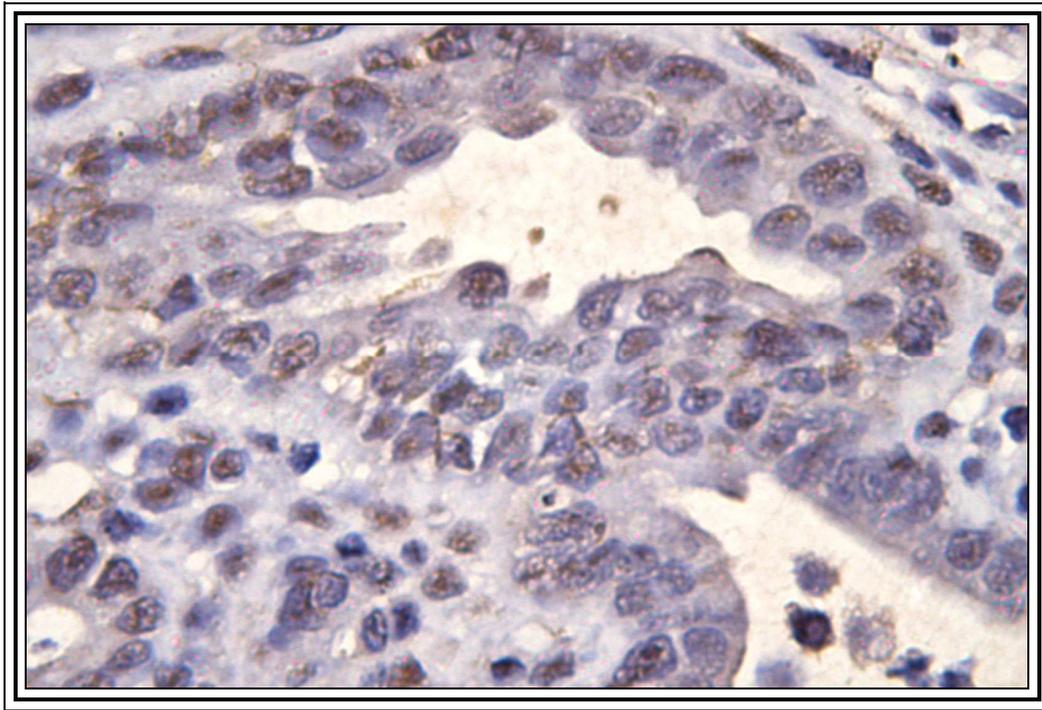


Foto n. 3: utero. Adenocarcinoma. Reazione immunoistochimica per anticorpo anti-PR. Positività nucleare. Ob. 63X.

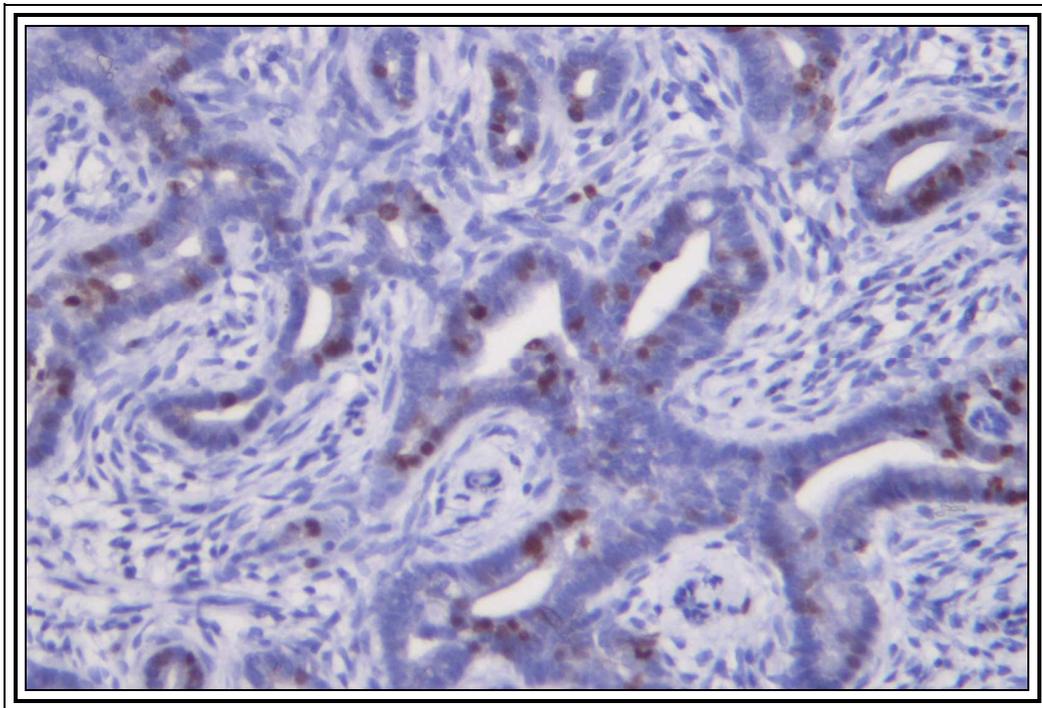


Foto n. 4: utero. Adenocarcinoma. Reazione immunoistochimica per MIB-1. Meno del 25% delle cellule epiteliali positive all'anticorpo. Ob. 20X.

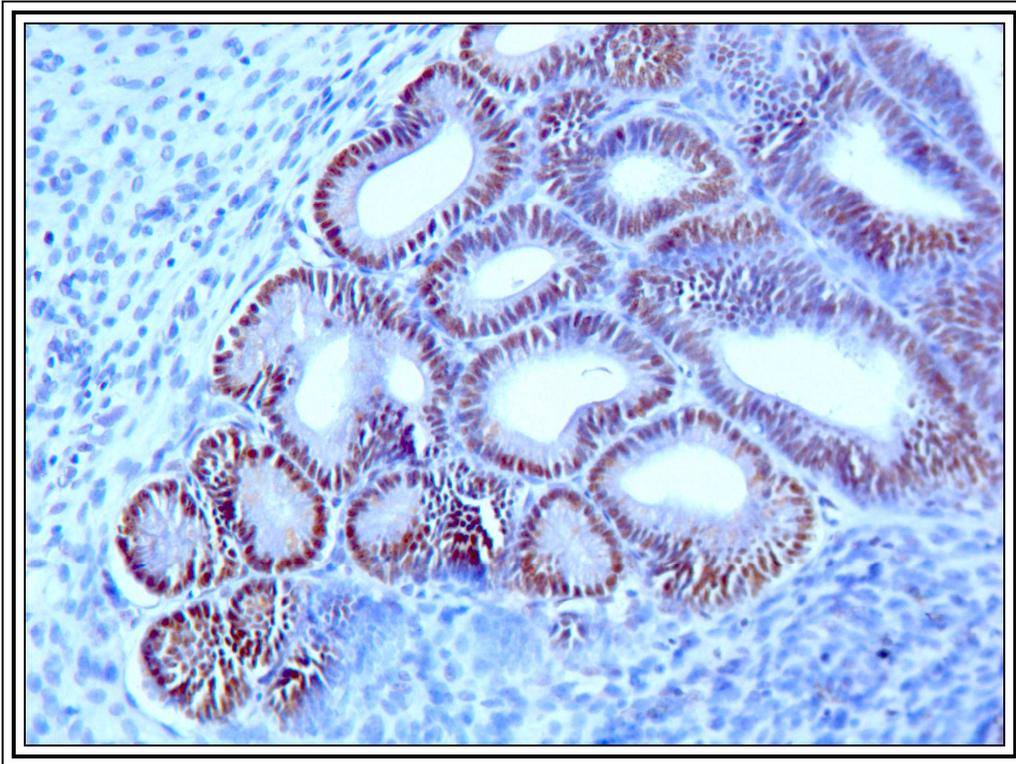


Foto n.5: utero. Adenoma. Reazione immunoistochimica per anticorpo anti-telomerasi. Positività nucleare. Ob. 10X.

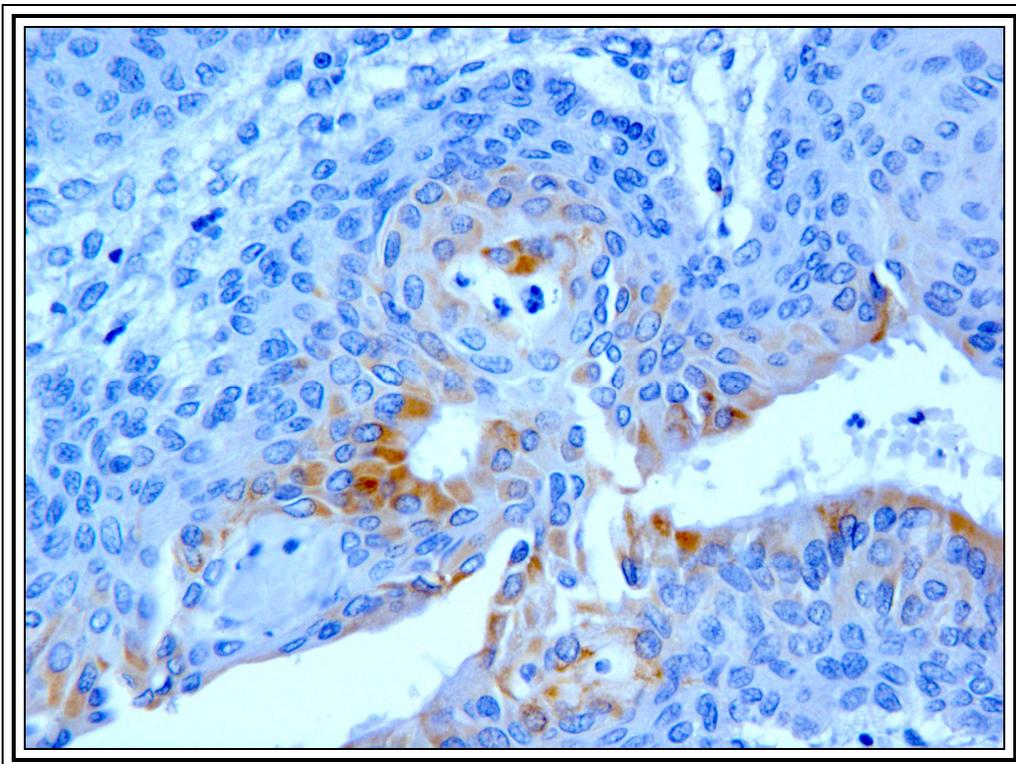


Foto n.6: utero. Adenocarcinoma. Reazione immunoistochimica per anticorpo anti-CK-19. Positività citoplasmatica multifocale delle cellule epiteliali. Ob. 20X.

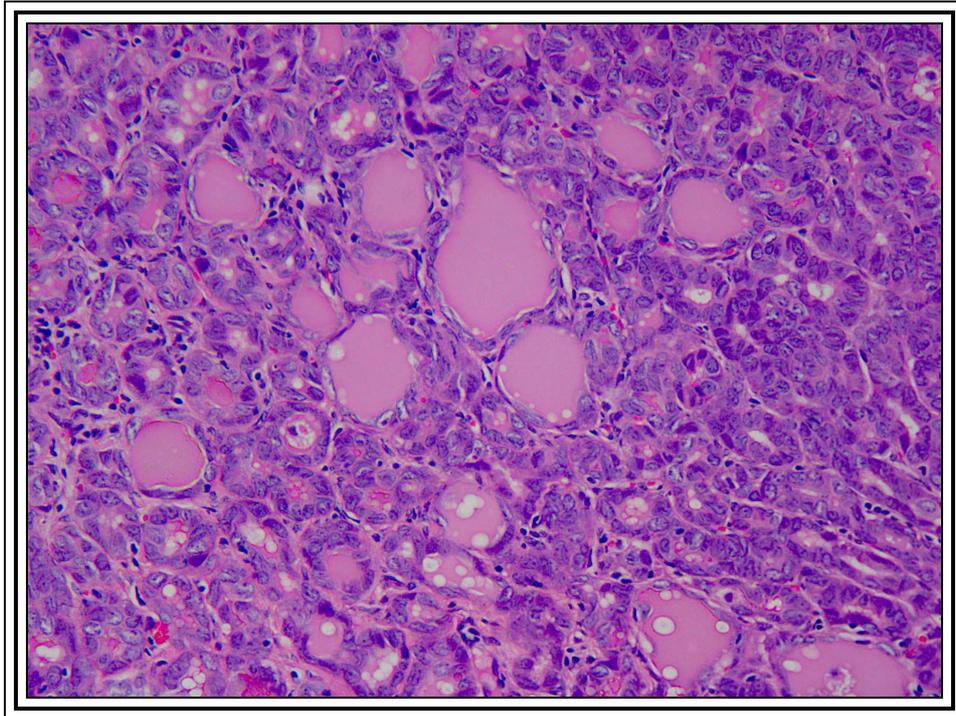


Foto n. 7: mammella. Adenoma tubulare. Tubuli di diversa forma e dimensione ripieni di secreto eosinofilo. EE. Ob. 10X.

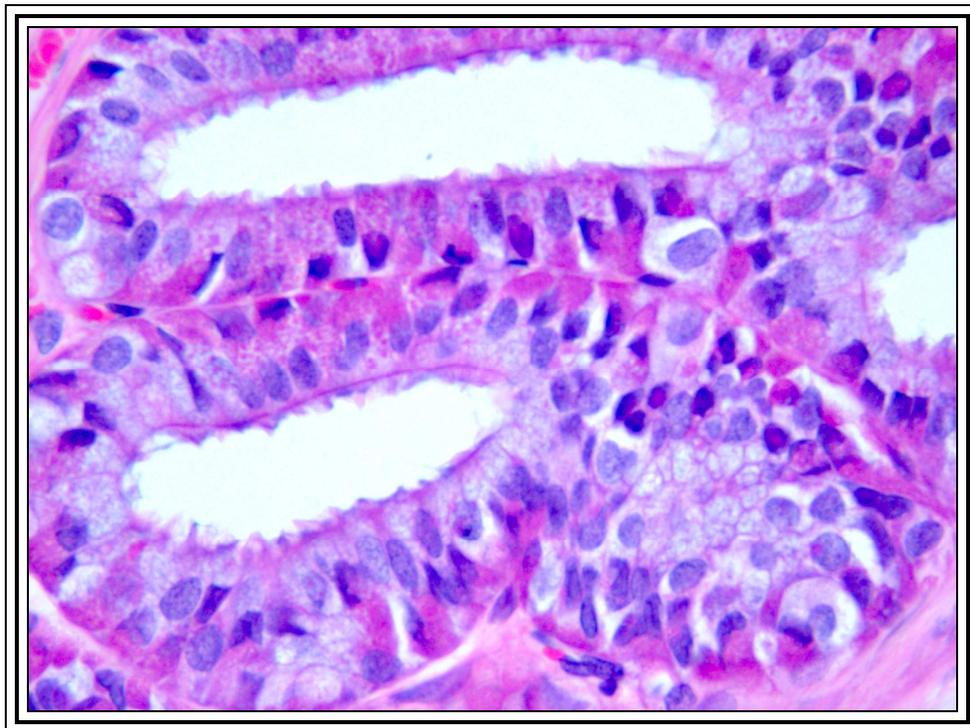


Foto n. 8: mammella. Adenoma tubulare. Epitelio tubulare monostratificato, evidenti aspetti di secrezione merocrina. EE. Ob. 40X.

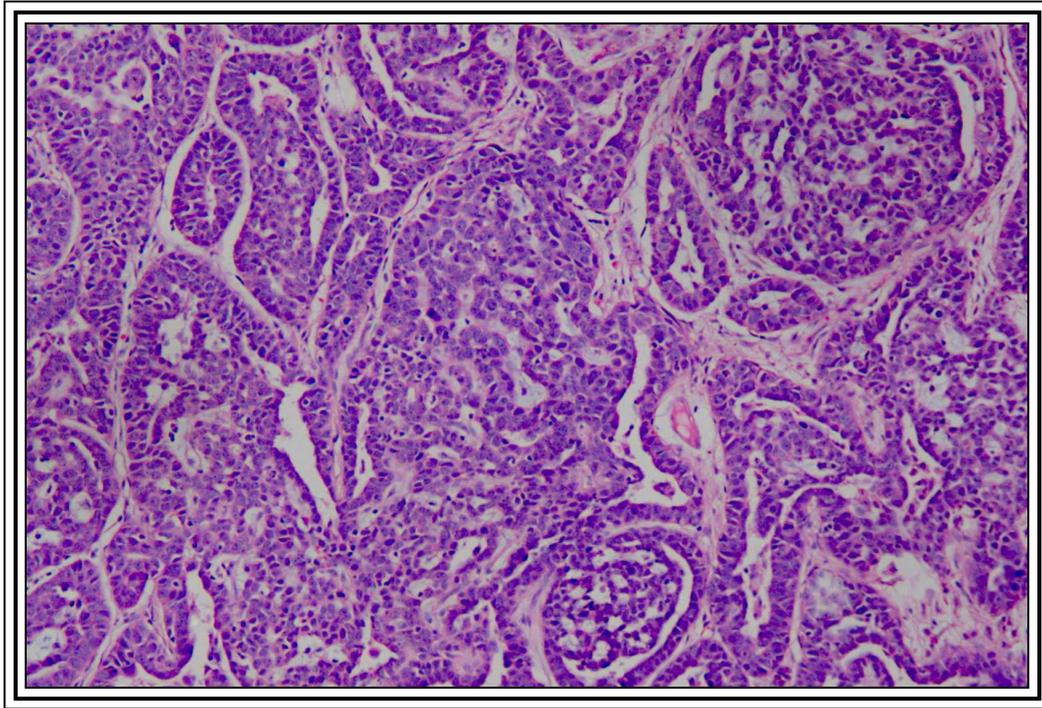


Foto n. 9: mammella. Adenocarcinoma tubulare. Cellule epiteliali organizzate in strutture tubulo-papillari con focolai tendenti al solido accompagnati da una moderata quantità di stroma fibroso di supporto. EE.Ob. 10X.

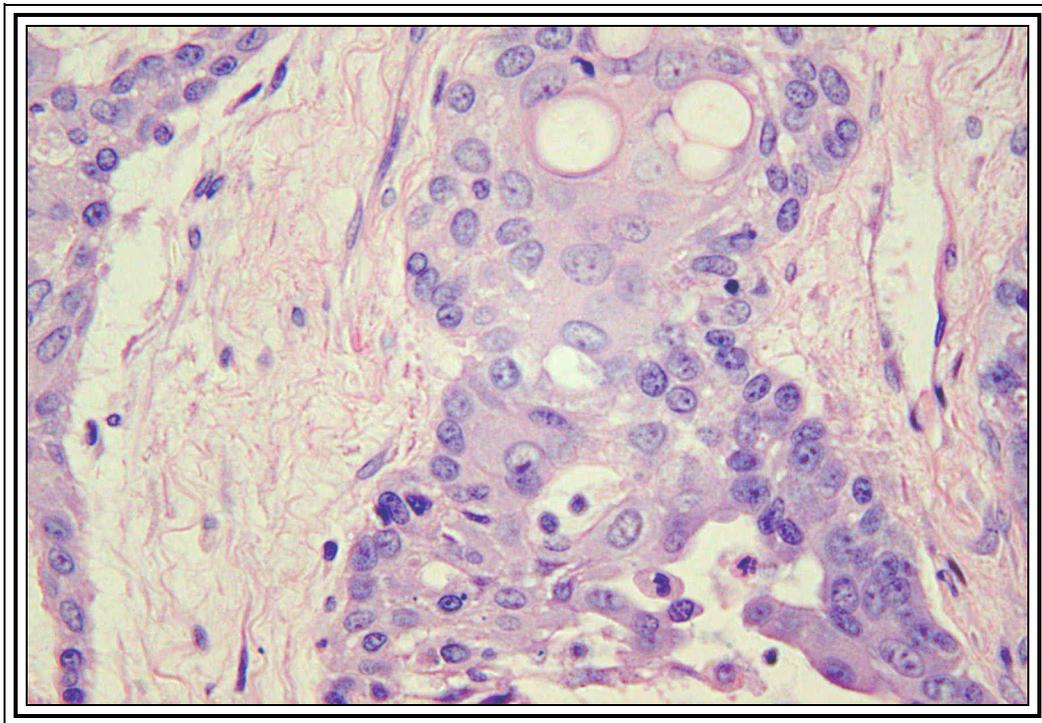
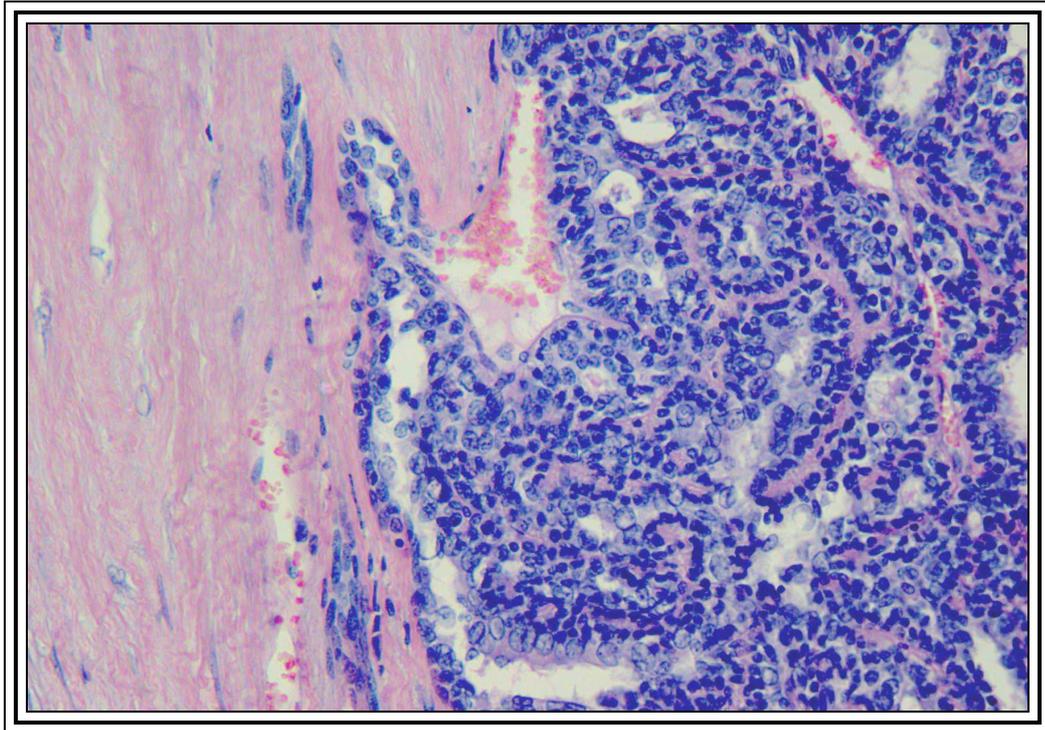
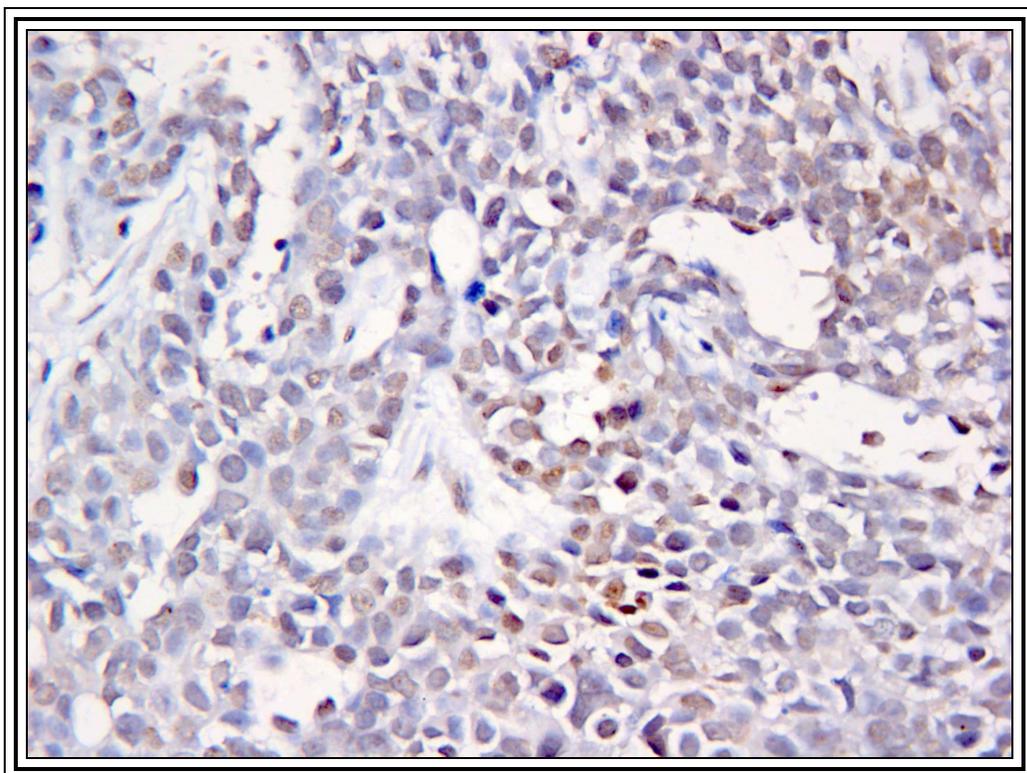


Foto n. 10: mammella. Adenocarcinoma tubulare. Presenza di focolai di metaplasia squamosa. EE. Ob. 40X.



*Foto n. 11: mammella. Adenocarcinoma. Invasività locale. EE.
Ob.20X.*



*Foto n. 12: mammella. Adenocarcinoma. Reazione
immunoistochimica per anticorpo anti-PR. Positività nucleare e
citoplasmatica. Ob. 40X.*

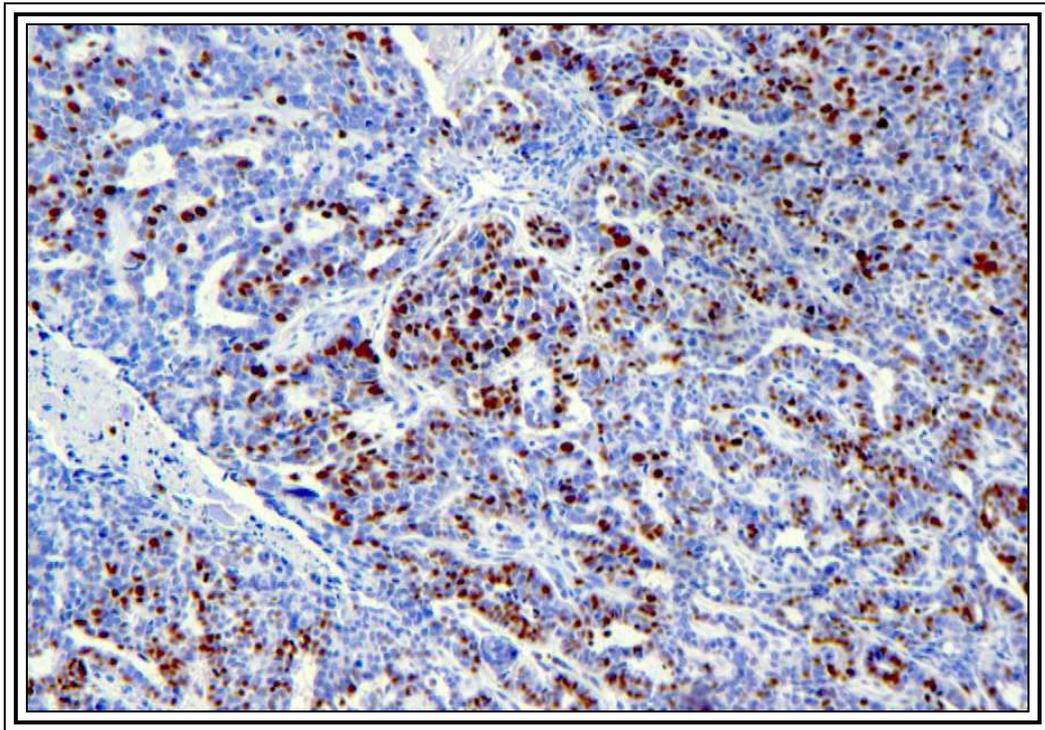


Foto n.13: mammella. Adenocarcinoma. Reazione immunoistochimica per MIB-1. Tra il 25 e il 50% delle cellule epiteliali mostrano una positività nucleare. Ob. 10X.

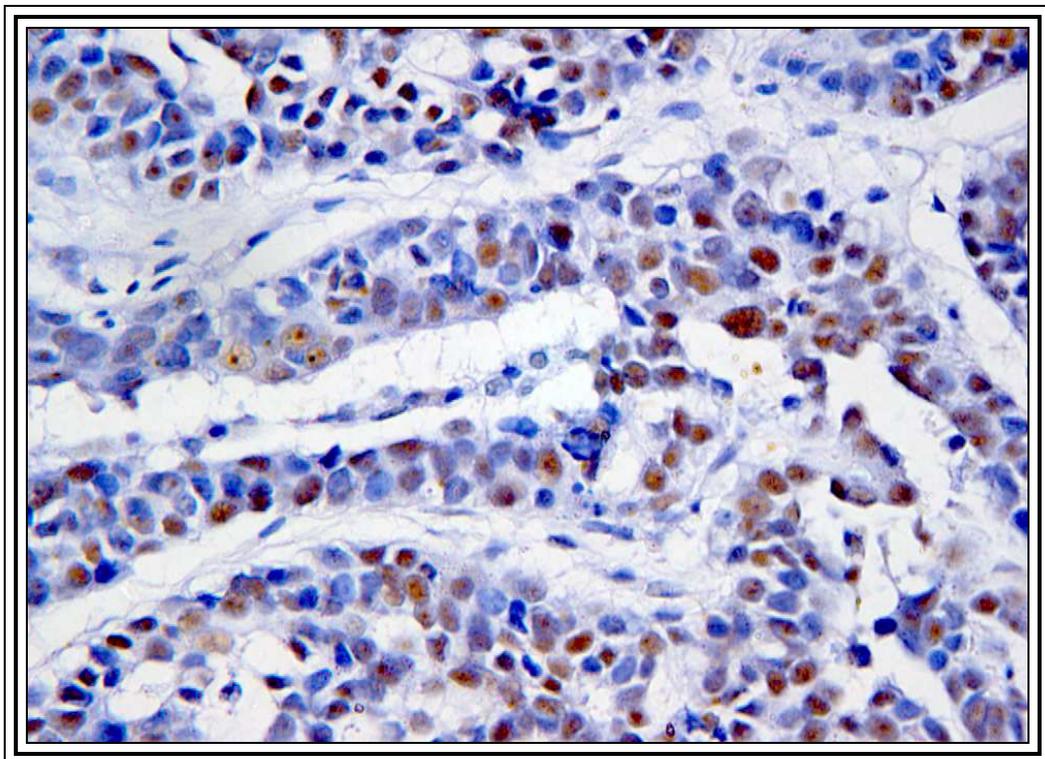


Foto n. 14: mammella. Adenocarcinoma. Reazione immunoistochimica per anticorpo anti-telomerasi. Positività nucleare. Ob. 20X.

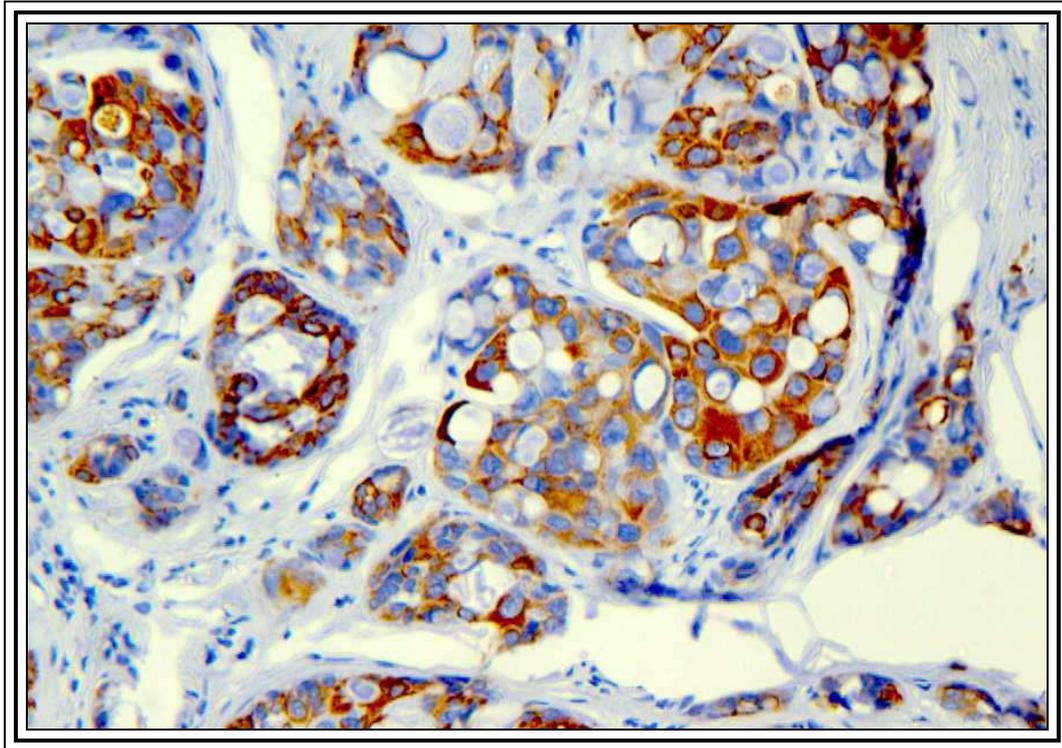


Foto n. 15: mammella. Adenoma. Reazione immunoistochimica per anticorpo anti-CK-19. Positività citoplasmatica delle cellule epiteliali. Ob. 20X.

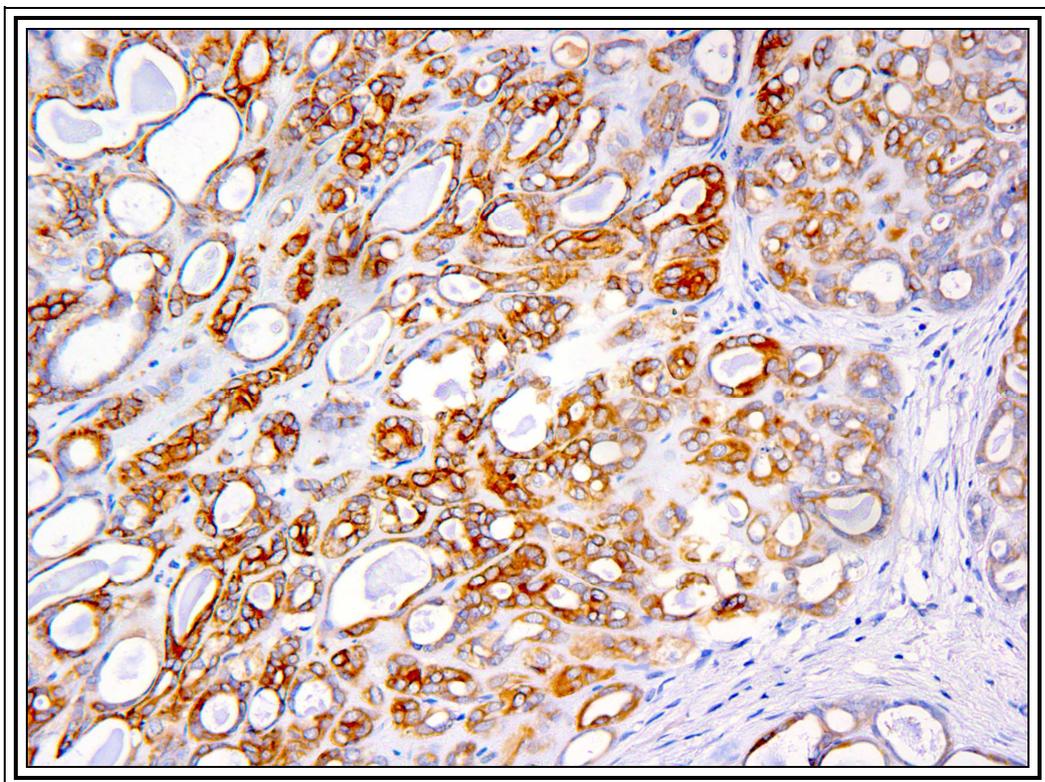


Foto n. 16: mammella. Adenoma. Reazione immunoistochimica per anticorpo anti-Cad-E. Positività citoplasmatica. Ob. 20X

BIBLIOGRAFIA

- Argyle DJ., Nasir L. (2003): *Telomerase: A potential diagnostic and therapeutic tool in canine oncology*. Veterinary Pathology 40, 1
- Asakawa M.G., Goldschmidt M.H., Une Y., Nomura Y. (2008): *The immunohistochemical evaluation of estrogen receptor- α and progesterone receptors of normal, hyperplastic and neoplastic endometrium in 88 pet rabbits*. Veterinary Pathology 45, 217
- Atherton J., Griffiths L., Williams A., (1999): *Cystic mastitis disease in the female rabbit*. Veterinary Record 144, 648
- Baba N., Von Haam E. (1972): *Animal model: spontaneous adenocarcinoma in aged rabbits*. American Journal of Pathology 68, 653
- Barone R. (1994): *Mammelle*. In “Anatomia comparata dei mammiferi domestici” Vol. 4, pag. 376. Edagricole, Bologna
- Barone R. (1994): *Utero*. In “Anatomia comparata dei mammiferi domestici” Vol. 4, pag. 267. Edagricole, Bologna.
- Brown FH. (2002): *Textbook of rabbit medicine*. Butterworth-Heimamm, Edinburgh.
- Burrows H. (1940): *Spontaneous uterine and mammary tumours in the rabbit*. Journal of Pathology 51, 385

- Charziantonou VD. (2001): *Telomerase: biological function and potential role in cancer management*. Pathology Oncology Research 7, 161
- Cooper TK., Adelsohn D., Gilbertson SR., (2006); *Spontaneous Deciduosa sarcoma in a Domestic Rabbit (Oryctolagus cuniculus)*. Veterinary Pathology 43, 377
- Cotchin E. (1964): *Spontaneous uterine cancer in animals*. British Journal of Cancer 21, 9
- Croce A. (2002): *Patologia neoplastica delle piccole specie esotiche*. “Animali esotici da compagnia”. Pag. 712. Poletto editore, Gaggiano (Mi).
- Ebina Y., Yamada H., Fujino T., Furuta I., Sakuragi N., Yamamoto R., Katoh M., Oshimura M., Fujimoto S. (1999): *Telomerase activity correlates with histo-pathological factors in uterine endometrial carcinoma*. International Journal Cancer 5, 529
- Elsinghorst A.M., Timmermans H.J.F., Hendriks J.M. (1984): *Comparative pathology of endometrial carcinoma*. The Veterinary Quarterly 6, 200
- Geraldès M., Gartner F., Schmitt (2000): *Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours*. Veterinary Record 146, 403

- Goto M., Nomura Y., Une Y., Goldschmidt MH., (2006): *Malignant Mixed Mullerian Tumor in a Rabbit (Oryctolagus cuniculus), Case Report with Immunohistochemistry*. Veterinary Pathology 43, 560
- Greene H.S.N., (1939): *Familial mammary neoplasia in the rabbit. I Clinical history. II Gross and microscopic pathology. III Factors concerned with their genesis*. Journal of experimental Medicine 70, 147-159-166-167
- Greene H.S.N., (1958): *Adenocarcinoma of the uterine of the uterine fundus in the rabbit*. Annual N.Y. Academy of Science 75, 535
- Greene H.S.N. and Saxton J.A., (1938): *Uterine adenomata in the rabbit. I. Clinical history, pathology and preliminary transplantation experiments*. Journal Experimental Medicine 67, 691
- Harkness JE., Wagner JE., (1995): *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*. Pag. 346. Williams & Wilkins, 4th ed., Usa.
- Hjartaker A., Langset H., Weiderpass E., (2008): *Obesity and diabetes epidemics: cancer repercussions*. Advanced Experimental Medical Biology 630, 72
- Hu X.F., Qian Y.F., Zhang C., Yu Y.Q. (2008): *A pilot study of hepatic fibrosis with magnetic resonance diffusion-weighted imaging in a rabbit model* (article in chinese). Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 16, 500

- Hillyer E.V., (1994): *Pet Rabbits*. In “Veterinary Clinics of North America: Exotic Pet Medicine II”. Pag.25. Eds K.E Quesenberry, E.V. Hillyer.
- Horowitz GM., Christensen S., Kennebeck C., Graham RL., (2000): *Postablative risk of endometrial carcinoma in New Zeland White Rabbits given high-dose estrogen*. Journal of Reproductive Medicine 45, 553.
- Hughes JE., Chapman W.L., Prasse K.W., (1981): *Cystic mammary disease in a rabbit*. Journal of the American Veterinary Medical Association 178, 138
- Ingalls TH., Adams WM., Lurie MB., Ipsen J. (1964): *Natural history of adenocarcinoma of the uterus in the Phipps rabbit colony*. Journal of National Cancer Institute 33, 799
- Ivanyi MD., Minke MHM., Hageman C., Groeneveld G., Doornewaard G., Misdorp W. (1993): *Cytokeratins as markers of initial stages of squamous metaplasia in feline mammary carcinomas*. American Journal of Veterinary Research 54, 1095
- Jones, Hunt, King (1997): *Genital tract*. In “Veterinary Pathology” 6th ed., pag. 1165. Wilkins & Wilkins, USA.
- Kaufmann A.F., Quist K.D., Broderson R., (1971): *Pseudopregnancy in the New Zeland White rabbit: necropsy findings*. Laboratory Animal Science 6, 865

- Kelley R.M., Baker W.H., (1965): *The role of progesterone in human endometrial cancer*. Cancer Research 25, 1190
- Knobil E., Neill J., (1998): “Encyclopedia of Reproduction” vol. 4. Academic Press, New York
- Lansdown A.B.G., Cook M.J., Dixon L.M., (1980): *Endometrial adenocarcinoma in a young rabbit*. The Veterinary Record 11, 353
- Lee S.H. (1989): *Coexistence of cytoplasmic and nuclear estrogen receptor*. Cancer 64, 1461
- Lipman N.S., Zhi-Bo Z., Andrutis K.A., Hurley R.J., Fox J.G., White H.J., (1994): *Prolactin-secreting pituitary adenomas with mammary dysplasia in New Zealand White Rabbits*. Laboratory Animal Science 44, 114
- Meissner W.A., Sheldon C., Sommers C., Sherman G., (1957): *Endometrial hyperplasia, endometrial carcinoma and endometriosis produced experimentally by estrogen*. Cancer 10, 500
- Mc Carty K.S., Barton T.K., Fetter B.F., Creasman W.T., McCarty K.S. (1979): *Correlation of estrogen and progesterone receptors with histologic differentiation in endometrial adenocarcinoma*. American Journal of Pathology 96,171
- Miller JB., (1999): *Rabbits*. In “Encyclopedia of reproduction”. Pag. 173.

- Monesi V. (1992): *Epiteli ghiandolari. Ghiandole*. In “Istologia”. 4th ed., pag. 460. Piccin editor, Padova.
- Moulton J.E. (1990): *Tumors of the mammary glands*. In “Tumours in domestic animals” 4th ed., pag. 45. University of California Press, Iowa.
- Murphy JP. (1997): *Ferrets*. “Rabbits and Rodents Clinical medicine and Surgery” Eds. Hiller EV., Quesenberry KE., Saunders Company, Usa.
- Nicholson R, Bouzubar N., Walker K.J., McClelland R., Dixon A.R. (1991): *Hormone sensitivity in breast cancer: influence of heterogeneity of oestrogen receptor expression and cell proliferation*. European Journal of Cancer 27, 908
- Oran I., Cutler MD., (1934): *Adenocarcinoma of the uterus in a rabbit*. American Journal of Cancer 24, 600
- Panarese S., Brunetti B., Sarli G. (2006): *Evaluation of telomerase in canine mammary tissues by immunohistochemical analysis and a polymerase chain reaction-based enzyme-linked immunosorbent assay*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 18, 362
- Panarese S., Sarli G. (2004): *Telomeri e telomerasi. Basi per l’immortalizzazione delle cellule neoplastiche*. Obiettivi e Documenti Veterinari 12, 35

- Polson (1927): *Tumors of the rabbit*. Journal of Pathology Bacteriology 30, 603
- Quinton JF. (2003): *Nouveaux animaux de compagnie: petits mammifères*. Masson, Paris.
- Robbins e Cotran (2005): *Adattamento cellulare, danno cellulare e morte cellulare*. In “Le basi patologiche delle malattie” 7th ed., pag. 43. Elsevier, Milano.
- Rutteman G.R. (1990): *Hormones and mammary tumour disease in the female dog: un update*. In Vivo 4, 33
- Saito K., Nakanishi M., Hasegawa A. (2002): *Uterine disorders diagnosed by ventrotomy in 47 rabbits*. Journal of veterinary medical science 64, 2002
- Sarli G., Sassi F., Brunetti B., Benazzi C. (2007): *Luminal-like A and B types in canine mammary carcinomas*. Atti 25th Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology 29 Agosto-1 Settembre 2007 Munich Germany, 188
- Sartin EA., Barnes S., Kwapien RP., Wolfe LG. (1992): *Estrogen and Progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs*. American Journal of Veterinary Research 53, 2196
- Shabani N., Mylonas I., Jeschke U., Thaqi A., Kuhn C., Puchner T., Friese K. (2007): *Expression of estrogen receptors alpha and beta*,

and progesterone receptors A and B in Human mucinous carcinoma of the endometrium. Anticancer Research 27, 2027

- Silverberg SG., Kurman RJ (1992): *Tumors of the uterine corpus and gestational trophoblastic disease*. In: “Atlas of Tumor Pathology” 3th ed. Pag.15. American Registry of Pathology, Washinton
- Sikoski P., Trybus J., Cline JM., Muhammad FS., Eckhoff A., Tan J., Lockard M., Jolley T., Britt S., Kock ND. (2008): *Cystic mammary adenocarcinoma associated with a prolactin-secreting pituitary adenoma in a New Zeland White Rabbit (Oryctolagus cuniculus)*. Comparative Medicine 58, 297
- Sommerville LM. (1998) : *Treatment of a uterine adenocarcinoma in a domestic rabbit by ovariohysterectomy*. Veterinary record 16, 550
- SymmersWC., Anderson MC (1991): *Female Reproductive System, Systemic Pathology*, 3th ed. Pag. 185. Churchill Livingstone, Edinburgh
- Takeichi M. (1991): *Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator*. Science 22, 1451
- Thuroczy J., Reisvaag G.J.K., Perge E., Tibold A., Szilagyi J., Balogh L. (2007): *Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours*. Journal of Comparative Pathology 137, 122

- Weisbroth SH., Flatt RE, Kraus AL (1974): *Neoplastic Disease*. In “The biology of laboratory rabbit”. Pag. 336. Eds. Weisbroth SH, Flatt RE., Kraus A. Academic Press, Usa.
- Weiss R.A. *et al.*, (1984) : *Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal disease : A 48-and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes*. Journal cell biology 98, 1397
- Zeimer A. G., Muller-Holzner E., Marth C., Daxenbichler G. (1994): *Immunocytochemical versus biochemical receptor determination in normal and tumours tissue of the female reproductive tract and breast*. Journal of steroid biochemistry and molecular biology 49, 365
- Zook BC., Janne OA., Abraham AA., Nash HA., (2001): *The development and regression of decidosarcomas and other lesions caused by estrogens and progestins in rabbits*. Toxicologic Pathology 29, 411.
- Zook BC., Spiro I., Hertz R., (1987): *Malignant Neoplasms of Decidual Origin (Decidosarcomas) induced by Estrogen-Progestin-Releasing Intravaginal Devices in Rabbits*. American Journal of Pathology 128, 315