

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Mediche Veterinarie

Ciclo XXXI

Settore Concorsuale: 07/H2

Settore Scientifico Disciplinare: VET/03

CARATTERIZZAZIONE CLINICO-PATOLOGICA DEI
TUMORI DEI TESSUTI MOLLI DEL CANE:
CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA, VARIABILI
PATOLOGICHE, E TARGET PER TERAPIE ADIUVANTI

Presentata da: Dott.ssa Valeria Pellegrino

Coordinatore Dottorato:
Chiar.mo Prof. Arcangelo Gentile

Supervisore: Chiar.mo Prof. Giuseppe Sarli

Correlatore: Chiar.mo Prof. Giancarlo Avallone

Esame finale anno 2019

Riassunto

Il progetto di dottorato ha riguardato la caratterizzazione clinico-patologica dei tumori dei tessuti molli del cane esaminandone la classificazione istologica e le variabili patologiche al fine di individuare possibili target per terapie adiuvanti, concentrando la ricerca sui tumori adipocitari e muscolaturi lisci (SMT) benigni e maligni.

Per quanto riguarda i tumori adipocitari maligni ho valutato l'espressione immunohistochimica di FGF2, FGFR1, PDGFB, PDGFR β , e c-kit nei liposarcomi del cane, comparandoli con conta mitotica e indice di proliferazione. Il *pathway* del PDGFB-PDGFR β sembra essere coinvolto nella proliferazione neoplastica ed è dunque un ottimo candidato come target terapeutico. Riguardo alle neoplasie adipocitarie benigne, ho descritto 6 casi di lipoma a cellule fusate (LCF), neoplasia poco caratterizzata nel cane, che è importante riconoscere per evitare diagnosi errate di sarcoma.

Per quanto riguarda i SMT gastrointestinali del cane ho testato l'efficacia del Tissue Micro Array (TMA) per la loro diagnosi. Questa tecnica è stata applicata per selezionare SMT. I criteri per la discriminazione dei SMT benigni e maligni sono scarse nella letteratura veterinaria. La casistica è stata analizzata con criteri di medicina umana e veterinaria per identificare parametri che aiutino a discriminare tra neoplasie benigne e maligne. Nei casi a carico dei tessuti molli (ST-SMT) sono infine state esaminate le caratteristiche clinico-patologiche e l'espressione dei recettori ormonali. La presenza di SMT positivi ai recettori ormonali a sede perineale, pelvica e retroperitoneali suggerisce l'esistenza di un sottogruppo distinto di ST-SMT canini che possono insorgere da leiomiociti sensibili agli ormoni in queste regioni anatomiche, come accade nell'uomo.

Abstract

Clinical-pathological characterization of canine soft tissue tumors: histologic classification, pathological variables, and target for adjuvant therapies

I focused my research on the clinical-pathological characterization of canine soft tissues tumors looking over the histological classification and the pathological variables to search possible target for adjuvant therapies, focusing on canine benign and malignant adipocytic and smooth muscle tumors (SMT).

I investigated the immunohistochemical expression of FGF2, FGFR1, PDGFB, PDGFR β , and c-kit in canine liposarcomas compared with mitotic counts and proliferation index to identify whether these pathways are involved in neoplastic progression and can therefore represent potential therapeutic targets. The PDGFB-PDGFR β pathway appears to be involved in the neoplastic proliferation and could be an excellent candidate as therapeutic target.

Regarding benign adipocytic neoplasms, I have described 6 cases of spindle cell lipomas (SCL), a benign neoplasm that may resemble an undifferentiated soft tissue sarcoma (STS) to characterize canine SCLs and avoid a misdiagnosis of STS.

Regarding canine SMT I tested the efficacy of *Tissue Micro Array* (TMA) in gastrointestinal spindle cell tumors. This technique has been applied to select SMTs. The criteria for discrimination of benign and malignant SMTs are scarce in veterinary literature. The caseload was analyzed with human and veterinary criteria to identify parameters to discriminate between benign and malignant neoplasms. In soft tissues-SMT have been examined as well as clinical-pathological features also hormonal receptors expression. The finding of some ER or PR positive soft tissue SMTs in perineal, pelvic and retroperitoneal regions, suggests the existence of a distinct subset of canine ST-SMTs that may arise from hormone sensitive leiomyocytes in these anatomical regions, as occurs in humans.

Sommario

Riassunto	2
Abstract	3
Introduzione ed obbiettivi	9
I tumori dei tessuti molli.....	9
I tumori dei tessuti molli nell'uomo	11
Epidemiologia	11
Sede	12
Eziologia.....	12
Caratteristiche cliniche	13
Fattori prognostici	13
Grado istologico.....	14
Diagnosi	16
Stadiazione	17
Nomogrammi.....	18
Terapia.....	19
I tumori dei tessuti molli nel cane	20
Classificazione.....	20
Epidemiologia	21
Eziologia.....	21
Caratteristiche cliniche	21
Caratteristiche istologiche.....	22
Grado	22
Terapia.....	24
Fattori prognostici dei sarcomi dei tessuti molli del cane	24
Target per terapie adiuvanti.....	26
Fattori di crescita con recettori tirosin-chinasici	26
Terapie ormonali	28
Neoplasie del tessuto adiposo dell'uomo	29
Neoplasie benigne del tessuto adiposo.....	29
Neoplasie maligne del tessuto adiposo.....	30
➤ Il tumore lipomatoso atipico ed il liposarcoma ben differenziato	31
➤ Liposarcoma dedifferenziato.....	32
➤ Liposarcoma mixoide e variante a cellule rotonde	32
➤ Liposarcoma pleomorfo.....	33

Neoplasie del tessuto adiposo del cane	34
Neoplasie benigne del tessuto adiposo.....	34
Neoplasie maligne del tessuto adiposo.....	35
➤ Lipoma atipico	36
➤ Il liposarcoma ben differenziato.....	37
➤ Il liposarcoma dedifferenziato.....	37
➤ Il liposarcoma mixoide.....	37
➤ Il liposarcoma pleomorfo	37
Studio 1: espressione dei recettori tirosin-chinasici e dei rispettivi ligandi, nei liposarcomi del cane	38
Obiettivo dello studio	38
Materiali e Metodi.....	38
➤ Criteri di selezione della casistica	38
➤ Valutazione istologica.....	38
➤ Immunoistochimica per i recettori tirosin-chinasici.....	39
➤ Indice di proliferazione	41
➤ Analisi statistica	42
Risultati.....	42
Discussione	48
Conclusioni	50
Pubblicazioni e comunicazioni congressuali inerenti	51
Studio 2: Il lipoma a cellule fusate nel cane: una nuova entità.....	52
Obiettivo dello studio	52
Materiali e metodi.....	52
➤ Selezione casistica	52
➤ Esame istologico ed istochimico.....	52
➤ Esame immunoistochimico	53
➤ Indice di proliferazione	54
Risultati.....	54
Discussione	55
Conclusioni	56
Pubblicazioni e comunicazioni congressuali inerenti	57
Documentazione fotografica neoplasie adipocitarie	58
Studio 1: espressione dei recettori tirosin-chinasici e dei rispettivi ligandi, nei liposarcomi del cane ...	58
Studio 2: Il lipoma a cellule fusate nel cane: una nuova entità.....	62
Neoplasie muscolari lisce dell'uomo	64
Neoplasie muscolari lisce benigne	64

Leiomiomi gastrointestinali	65
Leiomiomi uterini	65
Tumori muscolari lisci con potenziale maligno incerto	66
Leiomiomi cutanei	66
➤ Piloleiomiomi	66
➤ Leiomiomi cutanei genitali	67
Leiomiomi vascolari	67
Leiomiomi dei tessuti molli.....	68
Leiomiomatosi peritoneale disseminata	69
Neoplasie muscolari lisce maligne.....	70
Leiomiosarcomi intestinali.....	70
Leiomiosarcomi uterini.....	71
Leiomiosarcomi retroperitoneali e addominali.....	71
Leiomiosarcomi dei tessuti molli somatici	71
Leiomiosarcomi cutanei	72
Leiomiosarcomi di origine vascolare	72
Neoplasie muscolari lisce del cane	73
Neoplasie muscolari lisce benigne	73
Leiomiomi gastrointestinali	74
Leiomiomi genitali	74
Leiomiomi genitali femminili multicentrici.....	74
Leiomiomi cutanei	74
Leiomiomi splenici.....	75
Leiomiomi della cistifellea	75
Leiomiomi urinari	75
Leiomiomi dell'apparato respiratorio.....	75
Neoplasie muscolari lisce maligne (leiomiosarcoma)	76
Leiomiosarcomi gastrointestinali	76
Leiomiosarcomi genitali.....	77
Leiomiosarcomi cutanei	77
Leiomiosarcomi epatici e splenici.....	78
Leiomiosarcomi urinari.....	78
Studio 3: Validazione della tecnica dei <i>Tissue Micro Array</i> per la distinzione tra neoplasie muscolari lisce e GIST.....	79
Premessa	79
Obiettivo dello studio	79

Materiali e Metodi.....	80
➤ Criteri di selezione della casistica	80
➤ Costruzione dei TMA	80
➤ Immunoistochimica per α -sma, desmina e c-kit	82
➤ Valutazione dei risultati dell'immunoistochimica	82
Risultati.....	83
Discussione	84
Conclusione	85
Publicazioni e comunicazioni congressuali inerenti.....	86
Studio 4: Neoplasie muscolari lisce del cane: la sottile linea tra benigno e maligno.....	87
Obiettivo dello studio.....	87
Materiali e metodi.....	87
➤ Criteri di selezione della casistica	87
➤ Immunoistochimica	87
➤ Valutazione dell'indice di proliferazione	88
➤ Diagnosi di benignità e malignità	88
Follow-up.....	90
Risultati.....	91
Discussione	95
Conclusioni	96
Publicazioni e comunicazioni congressuali inerenti.....	97
Studio 5: Neoplasie muscolari lisce dei tessuti molli.....	98
Obiettivo dello studio.....	98
Materiali e metodi.....	98
➤ Selezione della casistica.....	98
➤ Valutazione istologica.....	98
➤ Immunoistochimica per i recettori ormonali	98
Risultati.....	100
Discussione	101
Conclusione	102
Publicazioni e comunicazioni congressuali inerenti.....	103
Documentazione fotografica neoplasie muscolari lisce.....	104
Studio 3: Validazione della tecnica dei <i>Tissue Micro Array</i> per la distinzione tra neoplasie muscolari lisce e GIST.....	104
Studio 4: Neoplasie muscolari lisce del cane: la sottile linea tra benigno e maligno.....	106
Studio 5: Neoplasie muscolari lisce dei tessuti molli.....	108

Bibliografia..... 111

Introduzione ed obbiettivi

I tumori dei tessuti molli

I tumori dei tessuti molli sono neoplasie mesenchimali che insorgono nei tessuti extra-scheletrici non epiteliali del corpo con l'esclusione dei visceri, delle meningi e del sistema reticoloendoteliale e che, embriologicamente, derivano dal mesoderma e, in parte, dall'ectoderma (Goldblum et al., 2014a; Horvai, 2015). L'ipotesi più accreditata è che originino da cellule mesenchimali pluripotenti, anziché da una retro-differenziazione cellulare (Horvai, 2015). In medicina veterinaria vengono classificati, ricalcando la classificazione che deriva dalla letteratura umana, sulla base del tessuto verso il quale si differenziano, il che raggruppa in questa grande famiglia una vastità di neoplasie dalle differenziazioni eterogenee, tra cui quella adipocitaria, muscolare (liscia e striata), fibrosa, vascolare e perineurale. All'interno di ogni categoria istogenetica queste neoplasie sono inoltre suddivise in forme benigne e maligne (Horvai, 2015).

Le neoplasie benigne sono morfologicamente simili ai tessuti da cui originano ed hanno una capacità replicativa limitata. È infrequente che invadano altri tessuti, ed in questa circostanza l'invasione è locale con un basso tasso di recidiva in seguito ad una terapia conservativa (Goldblum et al., 2014a; Horvai, 2015).

Le neoplasie mesenchimali maligne, denominate col termine sarcoma, sono caratterizzate da una crescita infiltrante e da recidive e metastasi a distanza. Per meglio definire il comportamento più o meno aggressivo di una neoplasia si valuta anche il grado istologico che comprende una serie di parametri, tra i quali la conta mitotica, la presenza e la quantità di necrosi e la differenziazione del tessuto inteso come similarità del tessuto neoplastico alla componente da cui origina. Generalmente i sarcomi ben differenziati hanno un basso grado istologico, comportamento opposto a quelli indifferenziati che tendono ad essere di alto grado (Goldblum et al., 2014a).

I sarcomi dei tessuti molli sono caratterizzati da un comportamento localmente aggressivo e da un potenziale metastatico da basso a moderato (Kuntz et al., 1997; McSporran, 2009). La terapia di elezione è la resezione chirurgica ed il fattore principale da tenere in considerazione a riguardo è il controllo locale delle recidive. La terapia chirurgica può essere o meno associata alla radioterapia, soprattutto nei casi di sarcomi inoperabili o con escissioni non complete (Liptak and Forrest, 2013). Inoltre, la radioterapia post-operatoria

associata ad una chirurgia marginale può essere un'alternativa valida per evitare amputazioni che avrebbero un impatto negativo sulla qualità di vita del paziente (Liptak and Forrest, 2013). Altre opzioni terapeutiche includono la chemioterapia metronomica e terapie adiuvanti.

La terapia farmacologica sembra essere poco efficace al momento, ma i recettori tirosin-chinasici, già usati come target farmacologico nei sarcomi dell'uomo (Liu et al., 2018), sembrano essere promettenti target terapeutici anche nella specie canina (Mantovani et al., 2016; Milovancev et al., 2016).

Le differenti opzioni terapeutiche devono comunque essere valutate a seconda dell'istotipo, della sede, della stadiazione, del grado istologico (Dernell et al., 1998; Liptak and Forrest, 2013). In medicina veterinaria una grande problematica in quest'ambito è rappresentata dalla mancanza di studi approfonditi sui diversi istotipi, in quanto la maggior parte degli studi tende a raggrupparli ed esaminarli come un'unica entità, disperdendo dati che potrebbero rivelare comportamenti diversi e generalizzando informazioni che caratterizzano un sottotipo più frequente ad altri che, plausibilmente, sono solo meno rappresentati. Tuttavia, in letteratura sono stati riconosciuti dei sottotipi con caratteristiche di malignità più spiccate, e questo rafforza l'ipotesi sopracitata che sottotipi diversi possano avere comportamenti biologici differenti. Proprio sulla base di queste premesse il mio dottorato si è sviluppato attraverso lo studio di tipologie di tumori dei tessuti molli diversi, attraverso studi di tipo classificativo, patogenetico e prognostico. Le categorie di neoplasie studiate hanno incluso:

- Le neoplasie adipocitarie
 - Valutazione dell'espressione di TKR nei liposarcomi
 - Caratterizzazione clinico-patologica dei lipomi a cellule fusate
- Le neoplasie muscolari lisce del cane
 - Caratterizzazione clinico-patologica
 - Validazione della tecnica dei *Tissue Micro Array* per la distinzione tra neoplasie muscolari lisce e GIST
 - Valutazione dell'espressione dei recettori ormonali nei tumori muscolari lisci extra-genitali

I tumori dei tessuti molli nell'uomo

Epidemiologia

L'incidenza reale dei tumori dei tessuti molli nell'uomo è difficile da stabilire soprattutto perché molte neoplasie benigne non vengono rimosse, ma il rapporto tra queste ed i sarcomi è sicuramente a favore delle prime (Goldblum et al., 2014a; Horvai, 2015). I sarcomi dei tessuti molli sono neoplasie rare e rappresentano meno dell'1,5% di tutte le neoplasie maligne riportate, con un'incidenza annuale di 6 su 100000 persone (Ferrari et al., 2011; Fletcher et al., 2013a; Goldblum et al., 2014a). Tuttavia, l'incidenza varia se messa in relazione all'età dei soggetti affetti, in quanto, come visto in uno studio retrospettivo che comprendeva l'analisi del database del Surveillance Epidemiology and End Results Database (SEER) in un periodo che includeva un totale di 33 anni per una casistica finale di 48012 campioni i bambini hanno un'incidenza decisamente più bassa. È riportato che nei soggetti inferiori a 10 anni ci sia un caso ogni 100000 persone, rispetto agli adulti in cui i sarcomi dei tessuti molli colpiscono circa 18 su 100000 persone. In particolare, l'incremento maggiore si verifica passando dai 30 ai 70 anni (Ferrari et al., 2011). L'incidenza aumenta quindi con l'avanzare dell'età, tuttavia, a sottolineare le peculiarità dei vari sottotipi, c'è l'evidenza che determinate categorie abbiano target di età differenti. Tra queste ricordiamo il rhabdomyosarcoma, tipico dell'infanzia, il sarcoma sinoviale dell'età giovane-adulta ed i liposarcomi, leiomyosarcomi, mixofibrosarcomi ed i sarcomi pleomorfi indifferenziati più frequenti negli adulti (Fletcher and Gronchi, 2013a; Horvai, 2015).

I pazienti giovani-adulti, di età inferiore ai 50 anni, hanno una sopravvivenza decisamente superiore rispetto agli anziani, ma nella maggioranza dei casi l'avanzamento della malattia è graduale, con l'unica eccezione del rhabdomyosarcoma (Ferrari et al., 2011).

Per quel che riguarda il genere c'è una prevalenza di 1,5:1 degli uomini rispetto alle donne (Ferrari et al., 2011; Fletcher and Gronchi, 2013a), ad eccezione del sarcoma alveolare e del leiomyosarcoma (Ferrari et al., 2011). Non sembra invece esserci nessuna differenza geografica significativa (Ferrari et al., 2011; Fletcher and Gronchi, 2013a; Goldblum et al., 2014a).

Sede

I tumori dei tessuti molli possono insorgere in ogni parte del corpo, anche se nella quasi totalità dei casi le neoplasie benigne sono localizzate superficialmente e sono inferiori ai 5 cm di diametro (Fletcher and Gronchi, 2013a; Goldblum et al., 2014a). I sarcomi dei tessuti molli, invece, nel 75% dei casi originano a carico degli arti inferiori, ed in particolare della coscia e nel 10% dei casi sono localizzati nel tronco o nello spazio retroperitoneale (Fletcher and Gronchi, 2013a; Goldblum et al., 2014a). Il 30% di quelli localizzati a carico di arti e tronco sono superficiali, con un diametro medio di 5 cm, mentre il 60% sono più profondi con un diametro medio di 9 cm. Questa differenza è probabilmente correlata al fatto che lesioni profonde devono raggiungere dimensioni maggiori prima di causare sintomi sistemici o locali, per cui la diagnosi è, solitamente, più tardiva (Fletcher and Gronchi, 2013a; Singer and Gronchi, 2013).

Eziologia

L'eziologia di queste neoplasie per la maggior parte resta sconosciuta e fattori quali l'esposizione a radiazioni, ustioni, tossine e agenti virali sembrano essere responsabili solo raramente del loro sviluppo (Fletcher and Gronchi, 2013b; Goldblum et al., 2014a). Tra le cause virali è importante ricordare lo *human herpesvirus 8*, agente eziologico del sarcoma di Kaposi (Fletcher and Gronchi, 2013b; Horvai, 2015) e l'*Epstein Barr virus* coinvolto nella patogenesi dei tumori muscolari lisci in pazienti con sindromi da immunodeficienza o in seguito a terapia immunosoppressiva post-trapianto (Goldblum et al., 2014a).

Una minoranza dei sarcomi dei tessuti molli è invece associata a mutazioni genetiche specifiche, che sembrano esserne la base patogenetica (Horvai, 2015). La loro individuazione è utile sicuramente per la comprensione della patogenesi e, per determinate neoplasie, può rappresentare anche il solo modo di ottenere una diagnosi certa, come nel caso, ad esempio, del sarcoma sinoviale. Si distinguono neoplasie a cariotipo semplice, che sono la minoranza, e che includono il 15%-20% dei sarcomi (Horvai, 2015). Queste sono caratterizzate da una o poche mutazioni cromosomiche che avvengono precocemente nella carcinogenesi e sono specifiche al punto tale da essere utilizzate come marker diagnostici. Le neoplasie a cariotipo semplice sono solitamente più frequenti in pazienti giovani e generalmente hanno un aspetto istologico più omogeneo. Sono presenti poi sarcomi a

cariotipo complesso, che costituiscono il restante 80%-85% del totale. Queste neoplasie sono aneuploidi o poliploidi e non hanno mutazioni stabili o ricorrenti, ma consistono in numerose alterazioni nel numero di cromosomi, il che sottintende un'instabilità genica importante. Appartengono a questo gruppo i leiomioidi sarcomi ed i sarcomi indifferenziati (Horvai, 2015).

Caratteristiche cliniche

Le caratteristiche cliniche sono spesso ingannevoli nel definire la malignità o benignità di questi tumori in quanto è frequente che le neoplasie che insorgono a carico delle estremità e del tronco non abbiano sintomi sistemici e non influenzino lo stato generale di salute, anche se di dimensioni considerevoli (Singer and Gronchi, 2013). Tuttavia, neoplasie che eccedono i 5 cm di diametro, così come quelle situate più profondamente nei tessuti, hanno un'alta possibilità di essere maligne (Singer and Gronchi, 2013).

Fattori prognostici

Le caratteristiche che influenzano la prognosi sono molteplici e includono l'istotipo, la localizzazione, le dimensioni, lo stadio ed il grado. Generalmente i sarcomi localizzati a carico di cute e sottocute hanno una prognosi migliore rispetto alle lesioni viscerali o comunque più profonde (Singer and Gronchi, 2013). A questo riguardo, i fattori prognostici più importanti nei sarcomi retroperitoneali sono la completezza dei margini chirurgici, il grado istologico e l'istotipo. In particolare, il liposarcoma ben differenziato e dedifferenziato, che sono i sottotipi più rappresentati nell'uomo, tendono ad avere recidive locali e multifocali. Il leiomioid sarcoma di alto grado invece ha la tendenza a metastatizzare a distanza, frequentemente al polmone ed al fegato (Singer and Gronchi, 2013).

Il 10% dei pazienti, al momento della diagnosi del tumore primario ha già metastasi identificabili, frequentemente a carico del polmone. Inoltre, un terzo dei pazienti affetti decede per cause correlate alla neoplasia, molti dei quali proprio a causa delle metastasi polmonari (Fletcher and Gronchi, 2013a).

Grado istologico

Nel corso degli anni sono stati proposti differenti sistemi di grading, ma il più utilizzato, e apparentemente il più sensibile, sembra essere quello stilato dalla French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group (FNCLCC). Il sistema si basa su dei parametri a cui vengono assegnati dei punteggi la cui somma determina il grado e che includono:

- La differenziazione delle cellule neoplastiche: intesa come similarità del tessuto neoplastico alla componente da cui origina. Questo è il parametro più soggettivo. Per ridurre questo problema ai singoli istotipi è stato assegnato un punteggio prestabilito.
- La presenza e la quantità di necrosi.
- L'indice mitotico valutato in 10 campi a forte ingrandimento (HPF) (Trojani et al., 1984).

Lo studio conclude che il grado istologico sia il singolo fattore più importante per predire la sopravvivenza, insieme alla localizzazione, intesa come profondità della neoplasia. La riproducibilità di questo sistema è stata testata da 15 patologi: da cui è risultato che il parametro con la concordanza migliore, pari all'81%, era lo scoring semi-quantitativo della necrosi, mentre sulla definizione del tipo istologico il risultato era pari al 61% (Trojani et al., 1984). Una delle problematiche principali è stabilire il livello di differenziazione della neoplasia, infatti questo è il parametro che risente di più della soggettività inter-patologo. Il punteggio che viene assegnato ad ognuna di queste caratteristiche permette infine di stabilire il grado del sarcoma (Tab.1).

		Punteggio
Differenziazione	Sarcomi con aspetto simile al tessuto mesenchimale adulto	1
	Sarcomi per i quali l'istotipo d'origine è identificabile, seppure scarsamente differenziati	2
	Sarcomi indifferenziati	3
Indice mitotico	0–9	1
	10–19	2
	>19	3
Necrosi	0	0
	<50%	1
	>50%	2
	Punteggio totale	Grado
	≤3	I
	4–5	II
	≥ 6	III

Tabella 1: Modificato da: *Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma.* (Coindre et al., 1986).

Il grado non può essere valutato dopo una terapia preoperatoria, in quanto l'aspetto istologico sarebbe influenzato dagli effetti terapeutici (Casali et al., 2018).

È stato comunque appurato che nessun sistema di grading attualmente esistente riesce ad essere adattabile a tutti i sarcomi dei tessuti molli (Coindre, 2013; Goldblum et al., 2014a). Esistono sarcomi per cui il sottotipo istologico è indicativo del comportamento ed in questi il grado risulta essere ridondante. Rientrano in questa categoria il liposarcoma ben differenziato, che risulta essere una neoplasia di basso grado che tende a non metastatizzare, al contrario della maggior parte dei sarcomi a cellule rotonde, come il rabdomiosarcoma alveolare, che invece sono per definizione di alto grado (Goldblum et al., 2014a). Un'altra problematica è quella dei sarcomi molto rari, come il sarcoma epitelioido, il sarcoma a cellule chiare o il sarcoma alveolare per i quali entrano in gioco caratteristiche non istologiche che influenzano la crescita e la prognosi con un impatto maggiore rispetto alle caratteristiche istologiche. Inoltre, queste neoplasie hanno un più alto rischio di metastasi a distanza a lungo termine, mentre nei primi cinque anni dalla diagnosi tendono a seguire maggiormente le statistiche che correlano con il grado. Infine, paragonandole a

sarcomi con il medesimo grado istologico tendono comunque ad avere un comportamento biologico più aggressivo (Goldblum et al., 2014a).

Diagnosi

La diagnosi dei tumori dei tessuti molli si basa principalmente sull'esame istologico coadiuvato da indagini collaterali tra cui indagini immunoistochimiche e citogenetiche. Per avere indicazioni rapide riguardo alla natura della massa, la citologia ottenuta tramite agoaspirato può dare ottime indicazioni se correlata all'aspetto clinico-radiologico e se interpretata da citopatologi esperti (Singer and Gronchi, 2013). L'osservazione di un esame citologico tuttavia può avere dei limiti importanti, per cui è sempre importante procedere con l'approfondimento diagnostico tramite biopsia e conseguente esame istologico (Domanski, 2007; Kumar and Chowdhury, 2007).

Inoltre, la biopsia delle masse dei tessuti molli può dare informazioni importanti per quel che riguarda l'istotipo, il grado e la prognosi (Singer and Gronchi, 2013). Devono tuttavia essere fatti campionamenti multipli con un *tru-cut* uguale o maggiore di 14-16 G e deve essere interpretata con cautela in quanto i sarcomi possono avere aspetti molto eterogenei ed i campioni esaminati possono non essere rappresentativi dell'istotipo e del grado della neoplasia esaminata. Se non eseguite in centri di referenza sarebbe sempre opportuno inviare i campioni esami a patologi esperti nel settore (Casali et al., 2018).

È consigliato lo stoccaggio delle biopsie congelate qualora in fasi successive si vogliano fare approfondimenti biomolecolari (Casali et al., 2018).

Per quanto riguarda le neoplasie viscerali non è solitamente richiesta la biopsia preoperatoria nel caso in cui *all'imaging* la massa sia suggestiva di entità quali un liposarcoma, o un tumore gastrointestinale stromale (GIST), che consentono una escissione chirurgica con una minima morbilità (Singer and Gronchi, 2013).

La diagnosi viene formulata in base alla classificazione del 2013 stilata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (Coindre, 2013).

Stadiazione

Con il termine stadiazione si intende la valutazione dell'estensione del processo neoplastico al momento della diagnosi al fine di stabilire la prognosi e quale sia l'approccio terapeutico più indicato. Per far questo si analizzano i fattori prognostici quali il grado, la dimensione della neoplasia e la presenza di metastasi (Goldblum et al., 2014a). I due sistemi di stadiazione più usati sono quello sviluppato dalla *The American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e dalla *Musculoskeletal Tumor Society*.

La stadiazione comprende una TC del torace e, nonostante le metastasi linfonodali siano molto rare, la valutazione dei linfonodi regionali tramite risonanza magnetica (Casali et al., 2018).

La stadiazione di un sarcoma dei tessuti molli è basata su aspetti multidisciplinari, dalla clinica, all'aspetto istologico e anatomopatologico. I pazienti dovrebbero essere comunque seguiti in centri di referenza e ulteriori studi prospettici sono necessari per testare e valutare i vari sistemi di grading e stadiazione.

Nomogrammi

Tutti i sarcomi date le peculiarità intrinseche dovrebbero essere analizzati in un contesto più ampio, andando a coniugare l'aspetto clinico, istologico e demografico. Per questo scopo, in medicina umana, si ricorre all'utilizzo dei nomogrammi. Questi sono degli strumenti di predizione che valutano parametri quali le dimensioni della massa, la localizzazione, la profondità, l'età del paziente, l'aspetto istologico ed infine il grado istologico fino ad ottenere una stima sulle probabilità di sopravvivenza e lo sviluppo di metastasi dopo rimozione chirurgica (Kattan et al., 2002; Goldblum et al., 2014a).

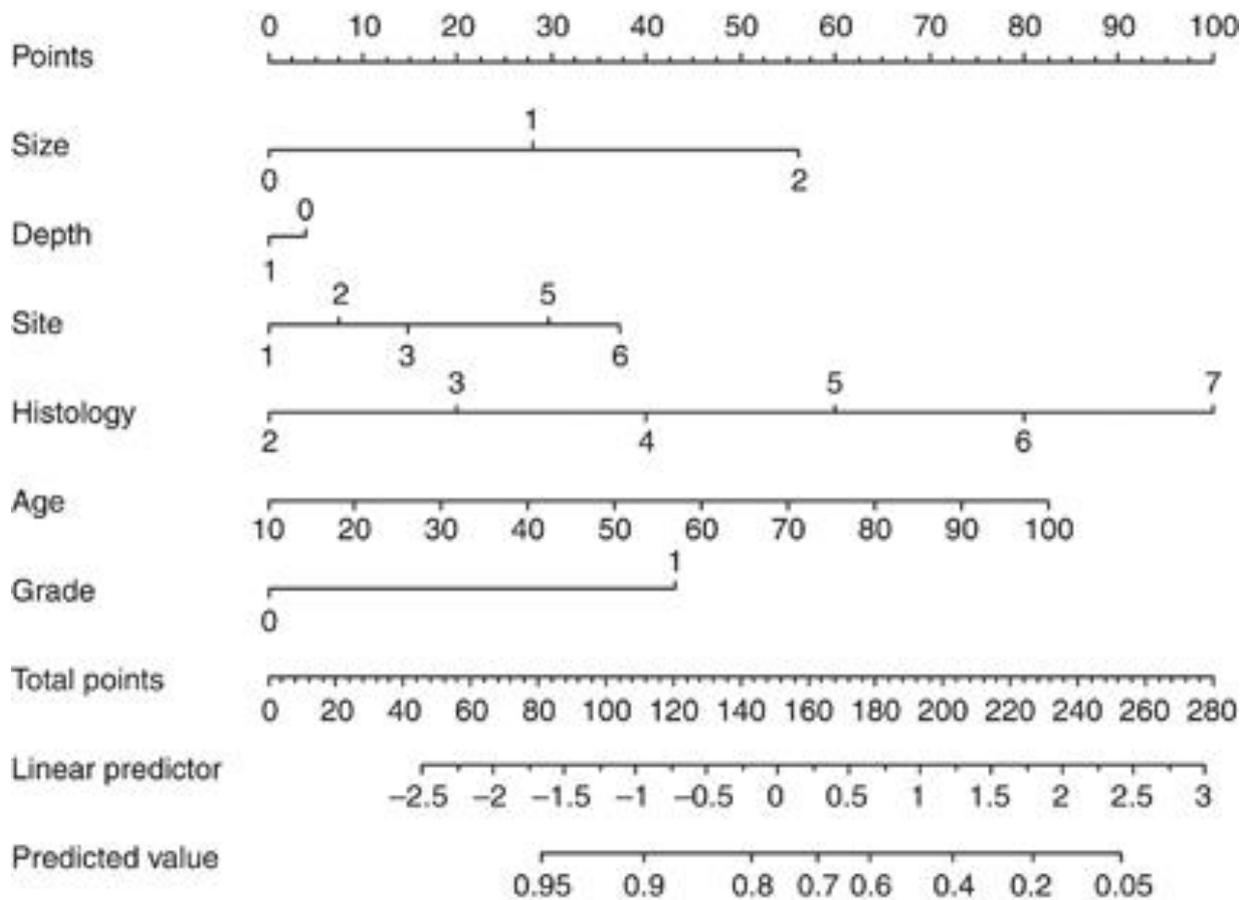


Figura 1. Esempio di nomogramma: modificato da "Postoperative nomogram for predicting 12-year Sarcoma-Specific Death", (Kattan et al., 2002).

Terapia

L'approccio terapeutico varia a seconda dello stadio: si passa dallo stadio 1, in cui è sufficiente l'escissione chirurgica ad ampi margini a stadi più alti in cui l'approccio terapeutico viene incrementato con la radioterapia e la chemioterapia, fino allo stadio quattro che implica un approccio personalizzato (Pisters, 1998; Nystrom et al., 2013; Crago and Brennan, 2015).

La terapia di elezione per i sarcomi dei tessuti molli è la chirurgia ad ampi margini, in quanto i margini chirurgici incompleti sono associati ad un rischio maggiore di recidive locali (Singer and Gronchi, 2013). Per ottenere dei margini liberi si deve sacrificare una quantità di tessuto sano che varia a seconda dell'istotipo, della sede e dalla presenza di barriere anatomiche fisiche (Casali et al., 2018). Tuttavia, a seconda della sede e delle strutture anatomiche adiacenti non è sempre possibile effettuare un approccio di questo tipo. A causa della tardività nella loro diagnosi, i sarcomi retroperitoneali raggiungono dimensioni maggiori e spesso presentano già invasione gli organi adiacenti. Questa problematica si riflette su una maggiore difficoltà nell'approccio chirurgico e nell'escissione ad ampi margini risultando in un minor tasso di sopravvivenza (Singer and Gronchi, 2013).

La radioterapia segue l'escissione chirurgica come trattamento standard nel caso di sarcomi di alto grado o nei sarcomi che originano in profondità o che superano i 5 cm di diametro (Casali et al., 2018). Nel caso la neoplasia sia localizzata a carico di un arto è possibile valutare l'opzione della chemioterapia e/o la radioterapia, o ipertermia associata alla perfusione con il *tumor necrosis factor* α e melphalan (Casali et al., 2018).

La risposta alla chemioterapia dipende dall'istotipo del sarcoma e dalla sede. Per i sarcomi di alto grado la scelta dell'uso della chemioterapia dipende dal rischio di metastasi, dalla sensibilità dell'istotipo e sottotipo, dall'età del paziente e da eventuali patologie concomitanti. Sono stati effettuati numerosi trial clinici che provano che la chemioterapia prolunghi il tempo libero da malattia, migliorando il controllo locale del tumore (Alvegård et al., 1989; Bramwell et al., 1994).

Sono state identificate alcune categorie che sembrano rispondere positivamente a chemioterapie preoperatorie specifiche (Scurr, 2011; Singer and Gronchi, 2013). Tra questi sono annoverati il liposarcoma mixoide, il liposarcoma pleomorfo, sarcomi pleomorfi indifferenziati ed i leiomiomasarcomi (Singer and Gronchi, 2013).

I tumori dei tessuti molli nel cane

Classificazione

I tumori dei tessuti molli del cane vengono classificati secondo un sistema classificativo che ricalca quello stilato per i sarcomi dell'uomo dall'organizzazione mondiale della sanità (WHO) (Coindre, 2013). Come per l'uomo, le neoplasie mesenchimali dei tessuti molli includono tutte quelle neoplasie che originano dai tessuti non epiteliali extra-scheletrici del corpo, che comprendo numerose entità aventi caratteristiche comuni. In letteratura veterinaria c'è discordanza sull'inclusione in questa categoria di alcuni istotipi, in quanto alcuni autori tendono a mantenere separate entità che sembrerebbero avere un comportamento più aggressivo. Tra questi rientrano il leiomiosarcoma, il rabdomiosarcoma, il fibrosarcoma della cavità orale ed il tumore dei nervi periferici (PNST) che coinvolgono il plesso brachiale (Dennis et al., 2011; Valli et al., 2017). Tuttavia, queste neoplasie rientrano nella classica definizione di tumori dei tessuti molli e sono state quindi considerate all'interno di questa tesi. Differente invece è il caso del sarcoma istiocitario e dell'emangiosarcoma esclusi a loro volta dalla classificazione per motivi differenti: il primo, nonostante la sua nomenclatura, non rientra nei tumori mesenchimali in quanto di origine istiocitaria (Gross, 2005a; Valli et al., 2017). Per l'emangiosarcoma invece il problema non riguarda le caratteristiche della neoplasia, che rientrerebbero perfettamente nella definizione di sarcoma dei tessuti molli, bensì il suo comportamento biologico, peculiare rispetto all'andamento generale degli altri sarcomi dei tessuti molli. L'emangiosarcoma, infatti è caratterizzato da un comportamento aggressivo, con metastasi precoci ed una prognosi infausta (Valli et al., 2017), motivi per il quale viene considerato da tutti gli autori come entità a sé stante. Anche a causa di queste incongruenze classificative gli studi attualmente pubblicati tendono ad essere difficilmente comparabili tra loro (Dennis et al., 2011; Liptak and Forrest, 2013). A complicare i dubbi diagnostici c'è il fatto che all'interno dello stesso tumore possano convivere pattern estremamente diversi (Dennis et al., 2011; Hendrick, 2017). Tutto ciò comporta che spesso vengano diagnosticati genericamente semplicemente come "sarcomi dei tessuti molli".

Epidemiologia

I tumori dei tessuti molli del cane comprendono lesioni sia benigne che maligne che possono originare in qualsiasi sede (Liptak and Forrest, 2013; Hendrick, 2017). I sarcomi dei tessuti molli del cane comprendono un'ampia ed eterogenea famiglia di neoplasie che comprende circa il 15% dei tumori cutanei del cane. L'incidenza annuale nel cane è di circa 35 su 100000 cani (Liptak and Forrest, 2013). Gli animali affetti comunemente sono di età medio-anziana e non è riportata predilezione né di sesso, né di razza, anche se i cani di grossa taglia sembrano essere leggermente più colpiti (Dennis et al., 2011; Gross, 2005b; Kuntz et al., 1997; Liptak and Forrest, 2013). Un'eccezione per quel che riguarda l'età di insorgenza è rappresentata dal rhabdomyosarcoma che, come nell'uomo, tende a colpire soggetti giovani (Liptak and Forrest, 2013).

Eziologia

La loro insorgenza è stata associata a diverse cause, tra le quali radiazioni, traumi, corpi estranei, impianti ortopedici ed il parassita *Spirocerca lupi* (Sinibaldi et al., 1976; Thrall et al., 1981; Barnes et al., 1990; Johnstone et al., 1996; McCarthy et al., 1996; Ranen et al., 2004).

Caratteristiche cliniche

Tra le caratteristiche che accomunano queste neoplasie si annoverano:

- La presenza di una pseudocapsula: la compressione dei tessuti circostanti alla periferia della neoplasia esercitata dalla crescita localmente espansiva o infiltrante esita nello sviluppo di una pseudocapsula. La sua presenza può rendere difficoltosa la reale distinzione dei margini durante l'escissione chirurgica.
- La crescita è localmente espansiva o infiltrante attraverso i piani fasciali con la presenza, in particolare per alcuni istotipi, di noduli satellite.
- I margini di escissione chirurgica incompleti sono predittivi di recidiva locale.
- Come diretta conseguenza le recidive locali sono più comuni nel caso in cui si effettui una terapia conservativa.

- Il 20% dei sarcomi dei tessuti molli del cane metastatizza per via ematogena; mentre le metastasi linfonodali sono estremamente inusuali.
- Il grado istologico sembra essere predittivo di metastasi.
- Le neoplasie superiori a 5 cm di diametro tendono a rispondere meno ai trattamenti terapeutici, quali chemioterapia e radioterapia (Liptak and Forrest, 2013), e sono più propensi a recidivare (Avallone et al., 2007; Stefanello et al., 2008).

Caratteristiche istologiche

Il loro aspetto istologico, seppur molto eterogeneo, è frequentemente costituito da fasci irregolarmente disposti di cellule fusate immerse in una quantità variabile di matrice collagene o, più raramente, mixoide (Hendrick, 2017). I pattern possono dare utili indicazioni sull'origine delle neoplasie, tra i più peculiari ricordiamo i vortici perivascolari del tumore perivascolare e la disposizione a lisca di pesce dei tumori della muscolatura liscia (Hendrick, 2017). In aiuto, quando l'aspetto istologico non è sufficiente per determinare la diagnosi, c'è l'immunoistochimica (Boerkamp et al., 2016). Tramite i marker immunoistochimici è possibile determinare l'origine neoplastica, caratterizzando tumori che possono avere aspetti istologici molto simili, ma origini e comportamenti differenti come nel caso dei tumori perivascolari e dei tumori dei nervi periferici (Avallone et al., 2007; Suzuki et al., 2014). Tuttavia, non sempre i differenti istotipi hanno fenotipi univoci, ma possono essere sovrapponibili, per cui anche congiungendo i risultati immunoistochimici e l'aspetto istologico non è sempre possibile determinare l'istotipo esatto (Williamson and Middleton, 1998; Chase et al., 2009; Boerkamp et al., 2016).

Grado

Nel corso degli anni si è ricorsi a numerosi sistemi di grading caratterizzati però da una inconsistenza generale dovuta a diversi fattori che ne inficiavano la qualità finale tra cui una scarsa numerosità delle casistiche, la mancanza di controlli, la mancanza di consistenza nei trattamenti terapeutici utilizzati e la mancanza di follow-up. Tuttavia, anche quando questi problemi vengono superati si riscontrano problemi di discordanza data da un'importante soggettività inter-patologo (Yap et al., 2017). Queste problematiche sono purtroppo attuali sia in medicina veterinaria che umana (Brown and Fletcher, 2000; Hendrick, 2017).

Bisogna ricordare che il fine ultimo dell'utilizzo di un sistema di grading è quello di categorizzare le neoplasie in categorie il più nette possibili. L'ideale sarebbe distinguere quelle con una buona prognosi, racchiuse nel basso grado, da quelle con prognosi infausta, comprendenti le neoplasie di alto grado. Nel basso grado idealmente dovrebbero rientrare i tumori che, sebbene localmente invasivi, abbiano uno scarso potenziale metastatico e che siano trattabili con la sola escissione chirurgica. L'alto grado invece dovrebbe racchiudere neoplasie che tendono a metastatizzare e per le quali il trattamento terapeutico comprenda delle terapie adiuvanti (Brown and Fletcher, 2000; Hendrick, 2017).

Oltre a questo, il grado è anche essenziale per includere e categorizzare i pazienti nei trial clinici (Brown and Fletcher, 2000).

Il grado istologico dei sarcomi dei tessuti molli è importante in quanto predittore di recidive locali e metastasi (Kuntz et al., 1997; Liptak et al., 2004; McSparran, 2009), ma non univoco. Esistono infatti dei *cut-off* ben determinati in medicina umana, ma non altrettanto standardizzati in veterinaria. Nella diagnostica della medicina umana alla necrosi dei sarcomi dei tessuti molli viene dato un punteggio semi-quantitativo sia a livello macroscopico che istologico, cosa che non è altrettanto utilizzata per la medicina veterinaria dove vengono utilizzati grading simili con *cut-off* differenti dal 10% (Kuntz et al., 1997) al 50% (McSparran, 2009), a seconda degli autori. Un'altra variabile è rappresentata dal fatto che l'area in mm³ in cui effettuare la conta mitotica non è standardizzata, il che va ad influire sulla determinazione del grado. Recentemente è stato pubblicato uno studio con il quale è stata standardizzata l'area da osservare per la conta dell'indice mitotico, eliminando così questa variabile dai sistemi di grading (Meuten et al., 2016). Grazie a questo studio è stata individuata un'area complessiva di 2.37 mm² ottenibile con rapidi calcoli a seconda dell'oculare e dell'obiettivo utilizzato (Meuten et al., 2016).

Alcuni studi di medicina umana hanno proposto inoltre l'utilizzo della valutazione dell'indice di proliferazione per valutare l'aggressività della neoplasia. Questa viene ottenuta tramite osservazione della reattività del campione all'anticorpo Mib-1 per ottenere una maggiore accuratezza (V. Jensen et al., 1996; Hasegawa et al., 2002).

Fatte queste premesse è opportuno specificare che il sistema di grading usato in veterinaria ricalca quello di Trojani *et al.* traslato dalla medicina umana (Trojani et al., 1984).

Le caratteristiche che meglio correlano con il grado sono il tasso di metastasi che risulta essere lo 0% per il primo grado e che aumenta rispettivamente al 27% e 22% nel secondo e terzo grado (Ettinger et al., 2006) e le recidive locali nei casi in cui i margini siano infiltrati (McSparran, 2009).

Nonostante questi dati è opportuno ricordare che il grado nei sarcomi dei tessuti molli è un elemento di grande rilievo, ma non può essere considerato come una caratteristica a sé stante per valutarne l'aggressività. Dato l'aspetto eterogeneo e spesso sovrapponibile dei diversi pattern dei sarcomi dei tessuti molli è essenziale avere una diagnosi il più specifica possibile fatta da un patologo esperto (Hendrick, 2017).

Terapia

La terapia di elezione per i sarcomi dei tessuti molli è, anche nella specie canina, la resezione chirurgica ad ampi margini. Sono caratterizzati da una crescita infiltrante attraverso i piani fasciali, il che rende spesso difficoltosa la rimozione completa. Inoltre, non sempre è possibile procedere con la resezione chirurgica e può essere importante affiancarla ad altre terapie come la chemioterapia e la radioterapia (Liptak and Forrest, 2013). La radioterapia ha un ruolo importante nel controllo locale del tumore, soprattutto nei casi di pazienti inoperabili o con escissioni chirurgiche incomplete (Forrest et al., 2000). Questa può essere associata alla chirurgia o meno a seconda della stadiazione del paziente (Liptak and Forrest, 2013).

Fattori prognostici dei sarcomi dei tessuti molli del cane

Per quanto riguarda i fattori prognostici dei sarcomi dei tessuti molli bisogna considerare differenti fattori: anche in medicina umana in passato venivano valutati come un unico gruppo, ma esistono sempre più studi che asseriscono che istotipi diversi abbiano *trend* differenti (Canter et al., 2010; Coindre, 2013). In veterinaria il problema è il medesimo, per cui, per meglio caratterizzare i diversi istotipi, negli ultimi anni sono cresciuti considerevolmente studi su istotipi specifici come i liposarcomi (Baez et al., 2004; Avallone et al., 2016), i tumori muscolari lisci (Pellegrino et al., 2018), i tumori perivascolari (Avallone et al., 2007) ed i tumori dei nervi periferici (Suzuki et al., 2014). Questi se fatti su ampio raggio permettono di caratterizzare e fenotipizzare con accuratezza sempre crescente le differenti neoplasie e, successivamente, valutare quali variabili possano influenzare la prognosi.

I sarcomi hanno un tasso di recidiva locale variabile tra il 7% ed il 30% e la probabilità di metastasi è circa del 17% (Kuntz et al., 1997; Liptak et al., 2004; Chase et al., 2009). Il

decesso dell'animale non è solitamente causato dalla neoplasia primaria in quanto frequentemente si tratta di soggetti anziani che decedono per cause non relative al tumore primario (Kuntz et al., 1997; Stefanello et al., 2008; Chase et al., 2009; McSporran, 2009). Il tempo di sopravvivenza medio dopo escissione chirurgica va dai 1013 ai 1416 giorni (Kuntz et al., 1997; Stefanello et al., 2008; Chase et al., 2009). Dati prognostici ulteriori sono necessari al fine di stabilire un protocollo terapeutico specifico per il tipo di paziente e di neoplasia.

Studi prospettici non sono semplici da delineare per diversi motivi: necessitano di grandi casistiche e, data la relativa rarità di queste neoplasie, non è semplice raccogliere una casistica ampia senza ricorrere a studi retrospettivi. La problematica in cui si incorre successivamente è che dei casi raccolti spesso non si conosce l'esito della malattia. Si dovrebbe ovviare con studi prospettici a lungo termine che raccolgano casi con lunghi follow-up dettagliati (Dennis et al., 2011).

Target per terapie adiuvanti

Fattori di crescita con recettori tirosin-chinasici

Tra i vari attori che entrano nel complesso meccanismo dell'oncogenesi rivestono un ruolo importante numerosi oncogeni che codificano per i recettori dei fattori di crescita (Kumar et al., 2015). Questi possono avere numerose cellule target e possono promuovere la sopravvivenza cellulare, la motilità, la contrattilità, il differenziamento e l'angiogenesi (Kumar et al., 2015). Un ruolo di prima linea in quest'ambito è rivestito dai recettori tirosin-chinasici. Questi recettori sono costituiti da un dominio extracellulare, una regione transmembrana ed una coda citoplasmatica con attività tirosin-chinasica intrinseca. Il legame del ligando con il dominio extracellulare porta la dimerizzazione del recettore, la fosforilazione della tirosina e l'attivazione del recettore (Kumar et al., 2015). La chinasi in forma attiva fosforila poi, e quindi attiva, numerose molecole effettrici disposte a valle che mediano gli effetti dell'interazione del recettore con il ligando (Kumar et al., 2015). L'attivazione di queste molecole può avvenire in maniera diretta o tramite l'intervento di proteine adattatrici (Kumar et al., 2015).

L'espressione dei recettori tirosin-chinasici, e dei rispettivi ligandi, è stata valutata in numerosi sarcomi dei tessuti molli del cane per investigare il loro eventuale impiego come target terapeutici. Questa famiglia comprende un numero molto ampio di fattori di crescita, ma i più indagati allo stato attuale, sia in medicina umana che veterinaria, sono il *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet-derived growth factor* (PDGFB), *fibroblast growth factor 2* (FGF2) ed i loro recettori.

Il VEGF è il principale fattore implicato nell'angiogenesi tumorale (Ferrara, 2000; Koutras et al., 2015) ed è stato proposto come indicatore prognostico in numerosi tipi di neoplasie (Maeda et al., 1996; Takanami et al., 1997). I sarcomi dell'uomo sono neoplasie altamente vascolarizzate e l'angiogenesi ha un ruolo fondamentale sulla progressione neoplastica. Studi in vitro hanno provato che queste neoplasie producono ingenti quantità di VEGF per l'uomo (Verheul et al., 2000), ed in numerose neoplasie anche nel cane (Chao et al., 2001; de Queiroz et al., 2010; Avallone et al., 2015).

L'angiogenesi è il processo per cui si formano nuovi vasi sanguigni da vasi preesistenti ed ha un comportamento ambivalente, sia fisiologico che patologico. È essenziale nello sviluppo, nella guarigione delle ferite, nella formazione di una circolazione collaterale in corso di ischemie e nella progressione delle neoplasie. Il meccanismo con il quale avviene

è stato a lungo studiato sia per cercare di favorirlo, nel caso in cui si voglia migliorare l'apporto sanguigno successivamente ad ischemie, che per inibirlo, al fine di arrestare o rallentare la crescita tumorale (Kumar et al., 2015). Uno dei fattori fondamentali che stimola la formazione di nuovi vasi è l'ipossia tissutale. I tessuti in queste situazioni, come accade anche nella porzione centrale di una neoplasia, rilasciano ossido nitrico, che stimola la produzione ed il rilascio di VEGF che stimola, di concerto con altri fattori, quali il PDGFB, la formazione di nuovi vasi. A questo segue il rimodellamento e la maturazione dei vasi neoformati. Questi successivamente ripristinano l'apporto di nutrienti ed il tutto si ripercuote su un calo dell'ossido nitrico, in risposta all'apporto dell'ossigeno, che implica infine una inibizione dell'angiogenesi. Nei tessuti tumorali però questo non accade perché le cellule hanno necessità molto superiori di nutrienti e ossigeno e quindi il feed-back negativo non avviene o avviene in maniera molto inferiore rispetto ai tessuti sani. Questo processo coinvolge diversi *pathway* e tipi cellulari, con interazioni intercellulari, tra le cellule neoplastiche e le proteine della matrice extracellulare e gli enzimi tissutali (Kumar et al., 2015).

Il limite di un tumore solido, come un sarcoma, anche se in possesso di tutte le aberrazioni genetiche richieste per la trasformazione maligna, è che non riuscirebbe a superare i 2 mm di diametro se non avesse la capacità di indurre angiogenesi (Kumar et al., 2015). Le neoplasie infatti richiedono un apporto di ossigeno e di nutrienti ingenti e la rimozione dei prodotti di scarto per cui la distanza di 2 mm è quella massima a cui queste sostanze possono diffondere dai vasi sanguigni. La neovascolarizzazione ha un duplice effetto sulla crescita tumorale: fornisce i nutrienti alla neoplasia, ed in contemporanea stimola la crescita neoplastica in quanto le cellule endoteliali neoformate rilasciano altri fattori di crescita, come l'*insulin-like growth factors* (IGFs) ed il PDGF. I vasi neoformati inoltre hanno caratteristiche alterate, con pareti discontinue, dilatazioni e decorso irregolare, tutti fattori che favoriscono l'invasione intravascolare e la disseminazione metastatica. L'angiogenesi è dunque controllata da un complesso bilanciamento tra fattori promotori ed inibitori. Nelle fasi iniziali della progressione neoplastica molte neoplasie non inducono angiogenesi e possono restare in una fase di quiescenza anche per anni, finché non si ha un incremento dei fattori promotori a scapito dei fattori inibitori (Kumar et al., 2015). Il VEGF è stato proposto come indicatore prognostico in diversi tipi di cancro (Maeda et al., 1996; Takanami et al., 1997) ed è il fattore di crescita maggiormente coinvolto nell'angiogenesi (Ferrara, 2000; Toi et al., 2001).

I sarcomi dei tessuti molli sono neoplasie riccamente vascolarizzate (Dirix and Van Oosterom, 1999) ed è stato provato in vitro che producono ingenti quantità di VEGF (Verheul et al., 2000). I sarcomi sia dell'uomo che del cane sembrano avere caratteristiche istologiche, presentazioni cliniche e comportamento spesso sovrapponibili (Ettinger, 2003). Studi in vitro hanno dimostrato che l'inibizione del *pathway* del recettore del FGF2 (FGFR1) porta alla riduzione della proliferazione cellulare (Valesky et al., 2002; Wang et al., 2004) ed all'inibizione dell'angiogenesi. Così come l'inibizione del recettore β del PDGF (PDGFR β) riduce la proliferazione, l'angiogenesi e l'espressione di molecole anti-apoptotiche (Taeger et al., 2011). Così come in medicina umana è stato dimostrato che i pazienti con sarcomi dei tessuti molli avevano livelli sierici superiori di FGF2 e VEGF rispetto a controlli sani (Graeven et al., 1999; Ruka et al., 2001), anche in cani affetti portatori di sarcomi dei tessuti molli presentavano una elevata concentrazione sierica di VEGF che diminuiva dopo la resezione chirurgica. L'espressione di FGF2, PDGFB e dei loro rispettivi recettori (FGFR1 e PDGFR β) è stata descritta in numerose neoplasie mesenchimali del cane, quali i tumori perivascolari (Avallone et al., 2015), tumori endoteliali (Yonemaru et al., 2006; Asa et al., 2012; Schweiger et al., 2015a), sarcomi associati a *Spirocerca Lupi* (Dvir and Clift, 2010) e fibrosarcomi (Schweiger et al., 2015a).

Terapie ormonali

Nei sarcomi con localizzazione genitale è stata vista una frequente espressione di recettori ormonali, in particolare per estrogeno (ER) e progesterone (PR) (Rao et al., 1999). Estrogeno e progesterone fanno parte della famiglia degli ormoni steroidei ed hanno recettori fisiologicamente distribuiti in tessuti diversi. Neoplasie con espressione di questi recettori sono state ampiamente descritte sia in medicina umana che veterinaria (Millán et al., 2007; Valkov et al., 2011; Davidson et al., 2016; Chen et al., 2017). La perdita dei recettori per gli ormoni è spesso correlata a caratteri di malignità più spiccata (Ma et al., 2016; Ramos et al., 2016). I recettori ormonali possono rappresentare un target terapeutico ed è stato suggerito l'uso di terapie progestiniche come terapie adiuvanti nei sarcomi endometriali stromali (Chu et al., 2003). Queste, tuttavia, non rappresentano terapie standard, nonostante studi retrospettivi segnalino una diminuzione delle recidive locali nei casi trattati. Sono descritte terapie con progestinici, inibitori dell'aromatasi e analoghi del Gn-RH per le pazienti in pre-menopausa per i sarcomi stromali endometriali (Rauh-Hain and del Carmen, 2013).

Neoplasie del tessuto adiposo dell'uomo

Neoplasie benigne del tessuto adiposo

Esistono numerose neoplasie adipocitarie dell'uomo classificate e descritte nella classificazione dell'organizzazione mondiale della sanità (Fletcher et al., 2013b). Le neoplasie adipocitarie benigne sono caratterizzate da una crescita espansiva, o localmente infiltrante e, nonostante possano raggiungere dimensioni notevoli, non hanno un comportamento aggressivo. I sintomi sono locali e legati alle dimensioni della massa ed al sito di insorgenza, in quanto la compressione su determinate strutture anatomiche può avere delle ripercussioni importanti (Goldblum et al., 2014b).

Molte lesioni non vengono rimosse e, a seconda della grandezza e della localizzazione, la terapia di elezione è l'escissione chirurgica o l'iniezione intratumorale di steroidi (Salam, 2002; Charifa and Badri, 2018). Le recidive locali si manifestano solo nel caso di escissioni incomplete (Salam, 2002).

Le neoplasie adipocitarie benigne sono tipicamente caratterizzate da una popolazione prevalente di adipociti maturi con delle caratteristiche peculiari che li rendono classificabili in numerosi istotipi. La classificazione delle neoplasie adipocitarie benigne racchiude numerose categorie: lipoma, lipoma intramuscolare infiltrante, lipoblastoma, angioliipoma, mioliipoma dei tessuti molli, lipoma condroide, lipoma pleomorfo o lipoma a cellule fusate e l'ibernoma (Fletcher et al., 2013b). Queste neoplasie sono tutte caratterizzate da un'ottima prognosi, recidivano solo in caso di escissioni incomplete, non metastatizzano e non progrediscono in forme maligne (Fletcher et al., 2013b). È importante riconoscerle e distinguerle dalle neoplasie adipocitarie maligne, che hanno prognosi e trattamenti terapeutici molto differenti (Salam, 2002; Su et al., 2011; Charifa and Badri, 2018).

In particolare, il lipoma intramuscolare infiltrante ha un pattern per alcuni aspetti sovrapponibile sia al lipoma che al liposarcoma ben differenziato. È costituito da adipociti maturi ben differenziati, ma ha una crescita che infiltra le masse muscolari adiacenti (Su et al., 2011) e, se la resezione chirurgica è incompleta, è frequente che recidivi (Salam, 2002; Su et al., 2011).

Un'altra neoplasia benigna che può indurre in errori diagnostici è il lipoma a cellule fusate o lipoma pleomorfo. Questo è composto da adipociti maturi e ben differenziati frammisti a fasci irregolari di cellule fusate con nucleo centrale, allungato, con cromatina grossolana e

nucleolo inapparente e fini prolungamenti citoplasmatici “bipolari” immersi in una matrice di sottili fibrille collagene, denominato “*ropey collagen*”, ed aree con abbondante matrice mixoide (Fletcher et al., 2013b). Anisocitosi ed anisocariosi sono lievi e le mitosi sono rare. All’interno di questa categoria sono presenti le varianti “*fat poor*” e “*fat free*”, che contengono rispettivamente scarsi o nulli adipociti maturi, fattore che rende più difficoltosa la diagnosi di questo raro istotipo (Sachdeva et al., 2009; Lin et al., 2012; Wang et al., 2013). Altre caratteristiche frequentemente presenti nel lipoma a cellule fusate sono la presenza di cellule neoplastiche multinucleate aggregate concentricamente a formare strutture fiorettiformi (Sachdeva et al., 2009), sottili vasi ramificati ed, occasionalmente, la presenza di un moderato numero di mastociti intraneoplastici. Lo spettro delle sue diagnosi differenziali è ampio e spazia da lesioni benigne come la fascite nodulare fino a lesioni maligne, dal dermatofibroma protuberans a molti altri sarcomi tra cui il liposarcoma ben differenziato ed il mixoide che hanno prognosi estremamente diverse dal lipoma a cellule fusate (Giriyan and Captain, 2013).

Neoplasie maligne del tessuto adiposo

Le neoplasie maligne del tessuto adiposo comprendono diverse varianti di liposarcoma (Fletcher et al., 2013b). Questo è il più comune sarcoma dei tessuti molli degli adulti ed ha una frequenza pari al 15% al 25% all’interno dei sarcomi nell’uomo (Goldblum et al., 2014b). I diversi istotipi hanno notevoli differenze citogenetiche, morfologiche e di comportamento biologico (Goldblum et al., 2014).

La classificazione dell’uomo descrive il tumore lipomatoso atipico o liposarcoma ben differenziato, il liposarcoma dedifferenziato, il mixoide, con la sua variante a cellule rotonde, ed il liposarcoma pleomorfo (Fletcher et al., 2013b).

Sebbene siano caratterizzati dalla presenza di adipociti, non è scontato identificare con facilità un liposarcoma. Infatti, non tutte le neoplasie che contengono lipidi sono liposarcomi (Singh et al., 2006; La Rosa et al., 2010; Guan et al., 2011) ed esistono delle caratteristiche specifiche che devono essere ricercate e riconosciute.

Tra queste la presenza di lipoblasti è un passaggio essenziale. Il lipoblasto è una cellula neoplastica che riproduce la differenziazione del tessuto adiposo normale (Goldblum et al., 2014b). I lipoblasti sembrano differenziarsi dall’avventizia pericapillare e acquisire gradualmente goccioline lipidiche intracitoplasmatiche che si accumulano dapprima ad un

polo della cellula ed espandono poi tutto il citoplasma. In questo processo il nucleo diviene dapprima indentato ed ipercromatico e poi viene dislocato e schiacciato alla periferia della cellula (Goldblum et al., 2014b). Il riconoscimento dei lipoblasti è importante per definire la natura adipocitaria di neoplasie con scarso contenuto lipidico, ma deve essere inserita in un contesto idoneo e compatibile con tale diagnosi e non può essere considerata come caratteristica isolata (Goldblum et al., 2014b). Inoltre, alcuni liposarcomi, come il liposarcoma ben differenziato sclerosante hanno pochi lipoblasti e la caratteristica principale per fare la diagnosi è il pattern tumorale (Goldblum et al., 2014b). D'altra parte, criteri imprecisi per l'identificazione dei lipoblasti spesso portano a diagnosi erronee di liposarcoma (Goldblum et al., 2014b). Il lipoblasto non è presente nel tessuto adiposo normale o nelle sue reazioni iperplastiche, per cui la sua identificazione è molto rilevante per discriminare le forme reattive (Goldblum et al., 2014b).

➤ **Il tumore lipomatoso atipico ed il liposarcoma ben differenziato**

Il tumore lipomatoso atipico ed il liposarcoma ben differenziato sono tecnicamente la stessa entità, sono cioè caratterizzati da adipociti ben differenziati ed hanno lievi caratteri di atipia e presenza di lipoblasti (Fletcher et al., 2013b; Nagano et al., 2015). Non metastatizzano, a meno che non vadano incontro a retro-differenziazione (Evans, 2007; Mavrogenis et al., 2011). Vengono classificati a seconda della sede di origine: come tumore lipomatoso atipico quando originano a carico degli arti o del tronco, dove è possibile effettuare una resezione chirurgica ad ampi margini, e come liposarcoma ben differenziato quando si trovano in sede retroperitoneale, dove la chirurgia è più difficoltosa, la possibilità di avere margini infiltrati è molto frequente, la diagnosi più tardiva e la probabilità di recidiva maggiore (Smith et al., 2012).

Il liposarcoma ben differenziato è caratterizzato da un cromosoma sovranumerario gigante ad anello con amplificazione dei geni che codificano per MDM2 e CDK4 (Dei Tos and Pedeteur, 2013). Il fattore prognostico più importante è la sede anatomica, in quanto non tende a recidivare se asportato completamente. Nei casi in cui origini a livello retroperitoneale, mediastinico o inguinale può causare il decesso del soggetto o a causa degli effetti locali, o per la retro-differenziazione e le metastasi (Smith et al., 2012).

La retro-differenziazione è accompagnata dall'acquisizione di caratteristiche di malignità più spiccate e può esitare nella progressione del liposarcoma dedifferenziato. A sostenere questa tesi c'è l'evidenza che queste due entità possiedono le medesime alterazioni citogenetiche (Dei Tos, 2000; Binh et al., 2005). Alcuni autori tendono così a considerare il

liposarcoma dedifferenziato ed il liposarcoma ben differenziato come i due estremi di un'unica entità biologica (Dei Tos, 2000).

Inoltre, i liposarcomi ben differenziati che originano a livello retroperitoneale hanno un comportamento più aggressivo ed una probabilità di retrodifferenziazione superiore al 20%, mentre quelli che originano a carico degli arti inferiore al 2%. Il tasso di mortalità è estremamente variabile a seconda della sede, passando da uno 0% per i liposarcomi ben differenziati che originano a carico degli arti ad un 80% per quelli a sede retroperitoneale (Weiss and Rao, 1992; Lucas et al., 1994).

➤ **Liposarcoma dedifferenziato**

Il liposarcoma dedifferenziato rappresenta la progressione del tumore lipomatoso atipico e del liposarcoma ben differenziato. È caratterizzato infatti dalle stesse alterazioni citogenetiche avendo un cromosoma sovranumerario gigante ad anello con amplificazione dei geni che codificano per MDM2 (Dei Tos et al., 2013). Istologicamente presenta aree di liposarcoma ben differenziato adiacenti alle quali sono presenti transizioni improvvise in aree prive di lipidi, solitamente di alto grado, somiglianti al sarcoma pleomorfo indifferenziato o al mixofibrosarcoma di alto grado. Le aree ben differenziate possono essere così scarse da non essere identificabili.

La dedifferenziazione avviene nel 10% dei liposarcomi ben differenziati, sebbene il rischio sia maggiore per le lesioni più profonde, in particolare per quelle site nello spazio retroperitoneale. Questo probabilmente è dovuto più alla diagnosi tardiva che alla sede in sé (Dei Tos et al., 2013), come è anche plausibile che per questo siano più frequenti in questa localizzazione, surclassando le altre sedi con un rapporto di 5:1 (Dei Tos et al., 2013).

➤ **Liposarcoma mixoide e variante a cellule rotonde**

Il liposarcoma mixoide comprende il 15-20% dei liposarcomi ed è caratterizzato da metastasi in sedi inusuali, come lo spazio retroperitoneale, il cavo ascellare, l'estremità degli arti e le ossa (Antonescu and Ladanyi, 2013, 2013). Istologicamente è contraddistinto da cellule ovali, contenenti scarsi lipidi e da occasionali lipoblasti in una abbondante matrice mixoide nel quale sono evidenti numerosi e sottili capillari ramificati, disposti in un pattern definito dal termine "*chicken wire*" (Antonescu and Ladanyi, 2013). Non ha un indice mitotico alto, né un marcato pleomorfismo cellulare. Tuttavia, è noto che abbia una variante a cellule

rotonde, che rappresenta la sua progressione neoplastica con caratteristiche di malignità più spiccate. Questa variante è caratterizzata da una diminuzione della componente mixoide e da una maggiore cellularità, con maggiori atipie cellulari (Antonescu and Ladanyi, 2013; Muratori et al., 2018). Entrambe sono caratterizzate dalle medesime alterazioni citogenetiche, il che è un'ulteriore prova che si tratti della stessa entità. In entrambe le entità si ha dunque una traslocazione ricorrente t(12; 16)(q13;q12) che risulta in una fusione del gene FIS-DDIT3 (Antonescu and Ladanyi, 2013).

➤ **Liposarcoma pleomorfo**

Il liposarcoma pleomorfo è un sarcoma di alto grado, con numerosi lipoblasti pleomorfi e con un profilo genetico complesso, con alterazioni variabili e classificato come sarcoma a cariotipo complesso (Coindre and Pedetoutour, 2013). È il sottotipo più raro, rappresentando infatti solo il 5% dei liposarcomi dell'uomo. Ha una maggiore incidenza nelle persone di sesso maschile ed è caratteristico dell'età avanzata. È più frequente a carico degli arti inferiori ed ha una crescita rapida, raggiungendo anche dimensioni pari a 10 cm di diametro (Gebhard et al., 2002; Ghadimi et al., 2011; Hornick et al., 2004; Wang et al., 2018). Sono caratterizzati da una crescita infiltrante e da aree estremamente eterogenee, con pochi lipidi e con porzioni composte esclusivamente da cellule fusate con marcata atipia e presenza di cellule neoplastiche giganti multinucleate (Downes et al., 2001; Gebhard et al., 2002; Ghadimi et al., 2011; Wang et al., 2018). Per questo sottotipo l'individuazione dei lipoblasti acquista una particolare importanza. Frequentemente sono presenti aree con differenziazione di mixofibrosarcoma di alto grado associate a lipoblasti, che possono essere predominanti in alcuni casi (Coindre and Pedetoutour, 2013).

Sono neoplasie aggressive, con un indice metastatico variabile dal 30 al 50% ed una sopravvivenza a 5 anni del 60%. Le metastasi sono frequenti a polmoni e pleura (Coindre and Pedetoutour, 2013).

Neoplasie del tessuto adiposo del cane

Neoplasie benigne del tessuto adiposo

Le neoplasie benigne del tessuto adiposo nel cane sono molto frequenti e sono predisposti gli animali di sesso femminile (Hendrick, 1998; Valli et al., 2017). Si tratta prevalentemente di lipomi composti da adipociti ben differenziati e da alcune varianti con particolari caratteristiche morfologiche. Troviamo quindi l'angioliipoma, l'angiofibrolipoma, l'angiofibrolipoma infiltrante (Liggett et al., 2002), il fibrolipoma (Gross, 2005c), il condrolipoma (Mutinelli et al., 2007; Woldemeskel and Whatley, 2008; Furumoto et al., 2017), il lipoma condro-osteoblastico (Ramírez et al., 2010), l'osteoliipoma (Woldemeskel and Whatley, 2008), il lipoleiomioma (Radi, 2005; Sycamore and Julian, 2011), il lipoma infiltrante (Mcchesney et al., 1980; Gross, 2005c), il lipoma intermuscolare (Thomson et al., 1999) e l'ibernoma (Ravi et al., 2014; Stuckey et al., 2015).

In linea di massima, così come per l'uomo, si tratta di neoplasie benigne che originano a carico del sottocute, più frequentemente nella regione del tronco, dei glutei o nella parte prossimale degli arti (Valli et al., 2017). Queste neoplasie generalmente sono demarcate, non capsulate, a crescita espansiva e di consistenza lardacea e macroscopicamente praticamente indistinguibili dal grasso sottocutaneo. La sintomatologia è legata al sito di insorgenza e possono causare problemi legati all'accrescimento e alla compressione della massa sui tessuti adiacenti (Hobert et al., 2013).

Non sono adese ai tessuti sottostanti e la rimozione chirurgica è relativamente semplice (Liptak and Forrest, 2013; Valli et al., 2017).

Un'eccezione in questo gruppo è rappresentata dal lipoma e l'angioliipoma infiltranti, in quanto hanno una crescita che infiltra i muscoli adiacenti. Sono morfologicamente identici al lipoma e all'angioliipoma ma invadono il tessuto connettivo adiacente ed il muscolo scheletrico, facendo acquisire all'area coinvolta un aspetto marmorizzato (Mcchesney et al., 1980).

La terapia di elezione è l'escissione chirurgica ed è importante l'esame istologico di tutta la lesione per esaminare il tipo di crescita e determinare il sottotipo, dato che lesioni come il lipoma infiltrante tendono a recidivare (McEntee et al., 2000). Tuttavia, in casi in cui la chirurgia è sconsigliata a causa della localizzazione o di strutture anatomiche importanti

adiacenti, o nei casi in cui la ferita chirurgica sia difficilmente cicatrizzabile o l'animale non sia in grado di sostenere una anestesia generale, esistono dei protocolli terapeutici alternativi (Lamagna et al., 2012). In particolare, ricordiamo l'iniezione intratumorale di calcio cloridrato che porta alla regressione della massa (Albers and Theilen, 1985). Tuttavia, sono stati riportati effetti collaterali tra cui necrosi tissutale ed irritazione cutanea (Albers and Theilen, 1985). Un'altra possibile opzione terapeutica è rappresentata dalla liposuzione, anche se con questo approccio è riportato un tasso di recidiva del 28% (Böttcher et al., 2007). Infine la radioterapia sembra dare ottimi risultati (McEntee et al., 2000).

Neoplasie maligne del tessuto adiposo

Le neoplasie adipocitarie maligne prendono il nome di liposarcomi, termine che raggruppa diverse entità che si differenziano per morfologia, comportamento e prognosi. I liposarcomi nel cane sono neoplasie relativamente rare, più frequenti nel pastore dello Shetland (Valli et al., 2017) e nel Beagle (Gross, 2005c). Non è descritta predisposizione di sesso, e l'incidenza aumenta con l'avanzare dell'età. Insorgono prevalentemente nel sottocute dell'addome e della parte prossimale degli arti (Hendrick, 1998; Baez et al., 2004; Gross, 2005c; Liptak and Forrest, 2013; Valli et al., 2017), o, più raramente, in cavità addominale, e nelle ossa (Liptak and Forrest, 2013). Le masse sottocutanee possono coinvolgere secondariamente il derma fino ad ulcerare la cute (Gross, 2005c).

Sono neoplasie localmente invasive e con un basso potenziale metastatico. Gli organi che vengono coinvolti secondariamente comprendono polmoni, fegato, milza e ossa (Liptak and Forrest, 2013).

L'aspetto macroscopico è molto variabile a seconda della quantità di lipidi che contengono: possono infatti avere un aspetto sovrapponibile ad un lipoma, lardaceo e non particolarmente consistente al taglio, fino ad acquisire una consistenza compatta ed un colore grigio-rosato, con margini indistinti ed una crescita infiltrante (Valli et al., 2017).

Come per gli altri sarcomi dei tessuti molli la terapia di elezione principale è l'escissione chirurgica ad ampi margini ed i principali fattori prognostici sono la completezza dell'escissione chirurgica (Liptak and Forrest, 2013) ed il grado istologico (Dennis et al., 2011).

I liposarcomi hanno una buona prognosi se asportati completamente (Kuntz et al., 1997; Baez et al., 2004; Liptak and Forrest, 2013). È stato stimato che il tempo medio di sopravvivenza dopo un'ampia resezione chirurgica sia di oltre tre anni, il che è

significativamente maggiore rispetto ad un'escissione marginale o ad una biopsia incisionale che hanno dei tempi medi di sopravvivenza molto inferiori, rispettivamente di 649 e 183 giorni (Kuntz et al., 1997; Baez et al., 2004; Liptak and Forrest, 2013).

L'organizzazione mondiale della sanità li classifica in tre sottotipi: il liposarcoma ben differenziato, il mixoide ed il pleomorfo (Hendrick, 1998). Negli ultimi anni è stato inoltre individuato e caratterizzato istologicamente e immunoistochimicamente il liposarcoma dedifferenziato, già descritto nell'uomo (Avallone et al., 2016; LaDouceur et al., 2017).

Nonostante le distinzioni istologiche, non è stata identificata una differenza nel comportamento biologico di queste varianti di liposarcomi (Baez et al., 2004), come invece accade nell'uomo in cui il liposarcoma pleomorfo ha un alto indice metastatico, il liposarcoma mixoide tende a dare metastasi in sede extra-polmonare e il liposarcoma ben differenziato è raro che metastatizzi (Chang et al., 1989; Evans, 2007; Mavrogenis et al., 2011; Coindre and Pedetoutour, 2013; Antonescu and Ladanyi, 2013). Gli studi in veterinaria sono più frammentari e spesso si tratta di casistiche retrospettive con mancanza di follow-up, per cui sono necessari ulteriori studi per indagare il comportamento dei diversi istotipi. Sembra esserci la tendenza del liposarcoma pleomorfo ad avere un comportamento più aggressivo, descritta in uno studio su 56 casi in cui tre su quattro liposarcomi metastatici erano pleomorfi. Ma data la bassa numerosità la tendenza, seppure presente, non può essere validata solo su questa base (Baez et al., 2004). Le recidive sono comuni, e le metastasi a polmoni, fegato o ossa sono rare (Baez et al., 2004; Liptak and Forrest, 2013; Valli et al., 2017).

➤ **Lipoma atipico**

Non incluso nella classificazione dell'organizzazione mondiale della sanità, il lipoma atipico è considerato da alcuni autori un tumore a bassa malignità e con caratteristiche istologiche sovrapponibili al lipoma con un lieve aumento della cellularità e scarsi lipoblasti irregolarmente frammisti a gli adipociti ben differenziati (Gross, 2005c). Il lipoma atipico è considerato da questi autori un liposarcoma di basso grado a tutti gli effetti (Gross, 2005c).

➤ **Il liposarcoma ben differenziato**

Il liposarcoma ben differenziato è caratterizzato da tappeti solidi di cellule da rotonde a poligonali frammiste ad una minima matrice collagene, in cui la maggior parte delle cellule ha delle goccioline lipidiche intracitoplasmatiche. La percentuale di cellule neoplastiche contenenti un solo vacuolo lipidico, che assomigliano quindi a normali adipociti maturi è estremamente variabile (Hendrick, 1998).

➤ **Il liposarcoma dedifferenziato**

Il liposarcoma dedifferenziato è sovrapponibile al suo omonimo presente in medicina umana. Queste entità presentano caratteristiche sovrapponibili ed esprimono MDM2 (Avallone et al., 2016). È caratterizzato da aree con cellule pleomorfe con scarsi o assenti lipidi e va in diagnosi differenziale con il fibrosarcoma o il sarcoma pleomorfo indifferenziato. L'immunoistochimica per MDM2 può permetterne la caratterizzazione e diagnosi (Avallone et al., 2016).

➤ **Il liposarcoma mixoide**

Questo è caratterizzato da cellule neoplastiche da fusate a rotonde immerse in una abbondante matrice ricca di mucina, ben evidenziabile con la colorazione Alcian-blue a pH 2,5. Deve essere messo in diagnosi differenziale con il mixosarcoma dal quale si distingue per la presenza di lipidi intracitoplasmatici in quantità variabile. Esattamente come nell'uomo è caratterizzato da sottili vasi che si intrecciano andando a creare una vascolarizzazione arborizzata (Hendrick, 1998).

➤ **Il liposarcoma pleomorfo**

Il liposarcoma pleomorfo è caratterizzato da cellule neoplastiche con un spiccato pleomorfismo cellulare e scarsi lipidi intracitoplasmatici, frammiste alle quali sono presenti un numero variabile di cellule neoplastiche multinucleate (Hendrick, 1998). Questa neoplasia va messa in diagnosi differenziale con il sarcoma anaplastico a cellule giganti (precedentemente noto come istiocitoma fibroso maligno), dal quale si differenzia per l'assenza di matrice collagene (Valli et al., 2017).

Studio 1: espressione dei recettori tirosin-chinasici e dei rispettivi ligandi, nei liposarcomi del cane

Obiettivo dello studio

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'espressione immunohistochimica di FGF2, FGFR1, PDGFB, PDGFR β , e c-kit nei liposarcomi del cane comparando la loro espressione con la conta mitotica e l'indice di proliferazione al fine di identificare se siano coinvolti nella progressione neoplastica e se possano quindi rappresentare dei potenziali target terapeutici.

Materiali e Metodi

➤ Criteri di selezione della casistica

Da un precedente studio retrospettivo sui liposarcomi del cane (Avallone et al., 2016) sono stati selezionati e classificati i casi in base all'aspetto istologico e alla reattività immunohistochimica come segue:

➤ Valutazione istologica

- Lipoma atipico: neoplasia composta da adipociti ben differenziati frammisti ai quali sono presenti occasionali lipoblasti atipici (Gross, 2005c).
- Liposarcoma ben differenziato: neoplasia composta da tappeti di cellule da rotonde a poligonali frammisti a scarsa o nulla matrice collagene. La maggioranza delle cellule contengono lipidi intracitoplasmatici (Hendrick, 1998; Valli et al., 2017).
I casi con un aspetto istologico intermedio tra il liposarcoma ben differenziato ed il pleomorfo sono stati classificati come ben differenziati se positivi all'immunohistochimica per MDM2 (Avallone et al., 2016).
- Liposarcoma pleomorfo: neoplasia composta da un marcato pleomorfismo cellulare, con cellule neoplastiche multinucleate e scarsi o assenti lipidi (Hendrick, 1998; Baez et al., 2004; Gross, 2005c; Valli et al., 2017).

I casi con un aspetto istologico intermedio tra il liposarcoma ben differenziato ed il pleomorfo sono stati classificati come liposarcoma pleomorfo quando risultavano negativi all'espressione di MDM2 (Avallone et al., 2016).

- Liposarcoma mixoide: neoplasia caratterizzata da un'abbondante matrice di mucina. Per questa caratteristica deve essere posto in diagnosi differenziale con il mixosarcoma, dal quale si distingue per la presenza di lipidi intracitoplasmatici. Inoltre sono solitamente presenti fini capillari che si anastomizzano in una rete che appare ben evidente istologicamente (Hendrick, 1998; Gross, 2005c; Valli et al., 2017).
- Liposarcoma dedifferenziato: neoplasia caratterizzata da aree di liposarcoma ben differenziato adiacenti alle quali sono presenti aree prive di lipidi ed istologicamente simili a fibrosarcoma di alto grado o al sarcoma pleomorfo indifferenziato (Fletcher et al., 2013a; Goldblum et al., 2014c; Avallone et al., 2016).

Per la valutazione del grado sulla casistica è stato seguito il sistema di grading applicato ai sarcomi dei tessuti molli (Dennis et al., 2011). La conta mitotica è stata valutata in 10 campi a forte ingrandimento per l'equivalente di un'area standard di 2.37mm² (Meuten et al., 2016).

➤ **Immunoistochimica per i recettori tirosin-chinasici**

Per ogni caso sono state tagliate al microtomo sezioni seriali di 3 micrometri di spessore, sottoposte a sparaffinatura e reidratate tramite passaggi seriali in alcool a concentrazioni decrescenti secondo protocolli standard. L'inibizione della perossidasi endogena è stata eseguita tramite immersione in H₂O₂ al 3% in metanolo per 30 minuti sotto cappa aspirata. Le sezioni sono poi state immerse in tampone citrato a pH 6.0 e sottoposte a 2 cicli di microonde a 750 W di 5 minuti ciascuno in microonde per lo smascheramento antigenico per gli anticorpi c-kit (Dako, Glostrup, Denmark) FGF2, FGFR1, PDGFB, e PDGFR β (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) e 4 cicli per Ki-67 (Dako) e lasciati poi raffreddare a temperatura ambiente per 20 minuti. L'origine, la diluizione ed il tipo di anticorpo sono riportati in tabella:

Antigene	Anticorpo	Tipo; Specie di origine	Diluizione	Casa produttrice
FGF2	FGF2 (147): sc-79	Policlonale; coniglio	1:200	Santa Cruz Biotech
FGFR1	Flg (C-15): sc-121	Policlonale; coniglio	1:400	Santa Cruz Biotech
PDGFB	PDGF-B (N-30): sc-127	Policlonale; coniglio	1:200	Santa Cruz Biotech
PDGFR β	PDGFR β (958): sc-432	Policlonale; coniglio	1:100	Santa Cruz Biotech
Ki-67	MIB-1	Monoclonale; topo	1:600	Dako
c-kit	A4502	Policlonale; coniglio	1:200	Dako

Tabella 2 Lista del pannello anticorpale utilizzato per i liposarcomi del cane con origine tipo, diluizione e casa produttrice degli anticorpi.

La reazione è stata poi amplificata con il metodo avidina-biotina (ABC kit elite; Vector, Burlingame, CA) ed è stato utilizzato come cromogeno il 3,30-diaminobenzidine allo 0.04% per 4 minuti. Le sezioni sono state controcolorate con l'ematossilina di Papanicolau, lavate in acqua corrente, disidratate con passaggi in una serie di alcool a concentrazioni crescenti e coperte con vetrino coprioggetto. Come controlli positivi sono stati utilizzati per FGF2, FGFR1, PDGFB e PDGFR β sezioni di tessuto di granulazione di cane, per Ki-67 sezioni di linfonodo iperplastico di cane, e per c-kit sezioni di mastocitoma cutaneo di cane di cui era nota l'espressione di c-kit. I controlli negativi sono stati ottenuti mediante l'omissione dell'anticorpo primario sulle sezioni seriali dei campioni utilizzati come controlli positivi. L'espressione di FGF2, FGFR1, PDGFB e PDGFR β è stata valuta in maniera semiquantitativa sulla sezione intera ad un ingrandimento intermedio (20x) stimando la percentuale di cellule neoplastiche positive ai diversi anticorpi. L'espressione di FGF2, FGFR1, PDGFB, e PDGFR β è stata classificata come elevata quando più del 70% delle cellule neoplastiche esprimevano questi antigeni, secondo uno schema classificativo semiquantitativo riportato in letteratura (Avallone et al., 2015). La variazione dell'intensità e la reattività dello stroma sono state osservate ma non incluse nel sistema di valutazione

finale perché giudicate inattendibili a causa della natura retrospettiva dello studio e dei tempi variabili di fissazione e conservazione in archivio dei tessuti esaminati. L'espressione di c-kit è stata classificata come positiva o negativa secondo quanto riportato in letteratura (Hayes et al., 2013; Jung et al., 2015).

➤ **Indice di proliferazione**

La conta delle cellule positive al Ki-67 è stata effettuata in un totale di 10 campi a forte ingrandimento (40x) contando un minimo di 1000 cellule per caso (fig. 2). I campi sono stati scelti individuando le porzioni più densamente cellulari delle neoplasie, evitando aree di necrosi, infiammazione ed artefatti da processazione. Sono stati selezionati e fotografati per ogni caso un totale di 10 immagini a forte ingrandimento ed è stato poi utilizzato un software per analisi di immagine, *ImageJ* 1.48, usando la funzione conta manuale per la conta cellulare. Per ogni immagine è stata calcolata la percentuale di cellule positive sul totale delle cellule presenti nei campi selezionati.

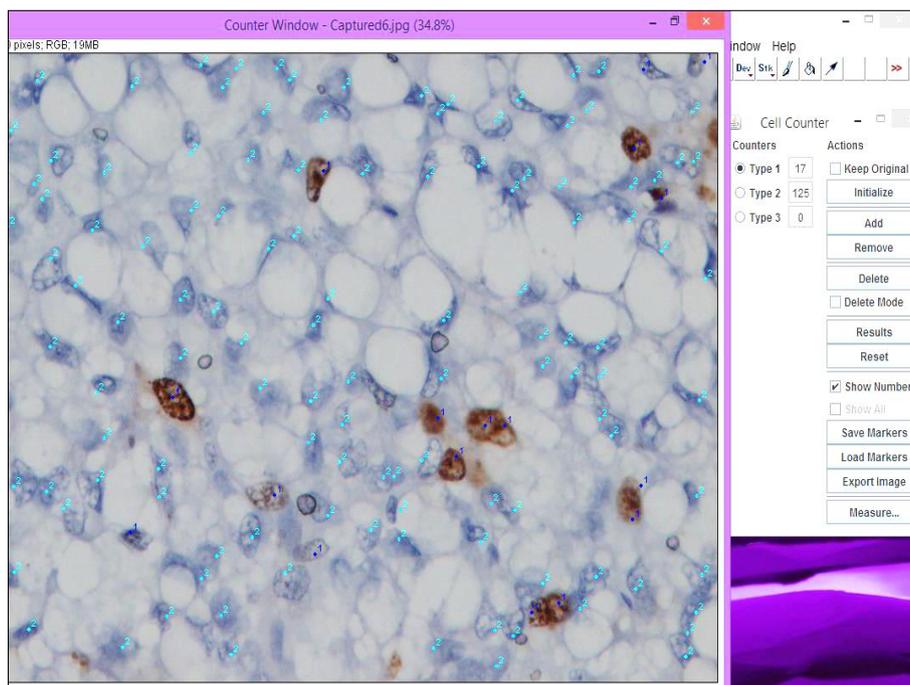


Figura 2: Software ImageJ utilizzato per la conta manuale. Immagine di un liposarcoma ben differenziato con colorazione immunoistochimica per ki-67, cromogeno DAB, e controcolorazione con ematossilina. Operazione di conta manuale effettuata per un minimo di 1000 per caso.

➤ Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con i test Shapiro e il Wilk's W test per la normalità dei dati. I dati, non avendo una distribuzione normale, sono stati quindi analizzati con il test di Spearman per comparare il grado, la conta mitotica, e l'indice di proliferazione con l'espressione di FGF2, FGFR1, PDGFB, PDGFR β e c-kit. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi quando avevano una $p \leq 0,05$.

Risultati

Sono stati esaminati un totale di 50 liposarcomi in 50 soggetti diversi. Quattordici sono stati classificati come liposarcomi ben differenziati, 7 come mixoidi, 25 come pleomorfi e 4 come dedifferenziati. Non sono stati identificati lipomi atipici.

Diciassette liposarcomi erano di grado 1, 26 di grado 2, e 7 di grado 3. I liposarcomi ben differenziati erano 10 di grado 1 e 4 di grado 2, i liposarcomi pleomorfi erano 7 di grado 1, 17 di grado 2 e 1 di grado 3, i liposarcomi mixoidi erano 4 di grado 2 e 3 di grado 3 ed i liposarcomi dedifferenziati erano 1 di grado 2 e 3 di grado 3 (Grafico 1).

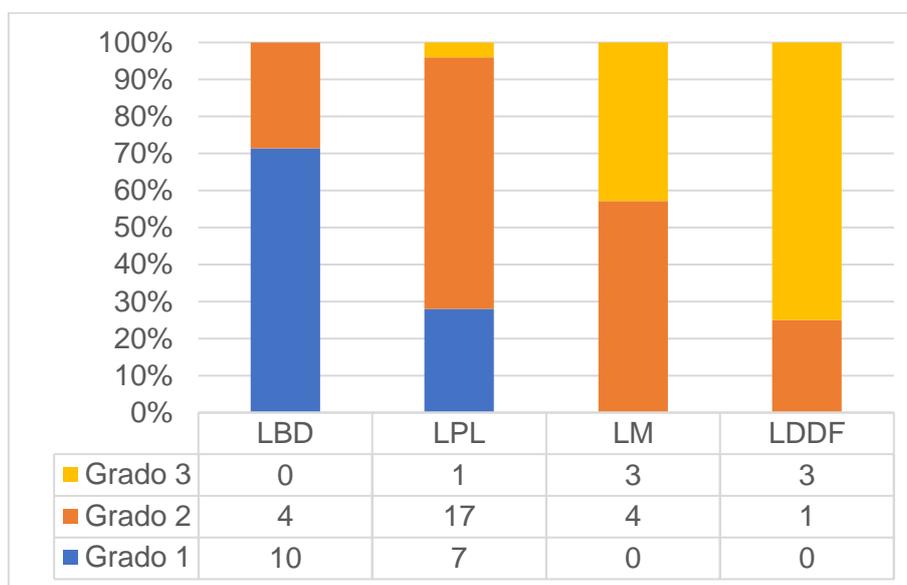


Grafico 1: Rappresentazione percentuale dei gradi dei diversi istotipi: liposarcoma ben differenziato (LBD), liposarcoma pleomorfo (LPL), liposarcoma mixoide (LM), liposarcoma dedifferenziato (LDD).

Degli animali affetti 36 erano maschi di cui 3 castrati ed 11 erano femmine, di cui 2 sterilizzate di 3 il sesso non era presente in anamnesi.

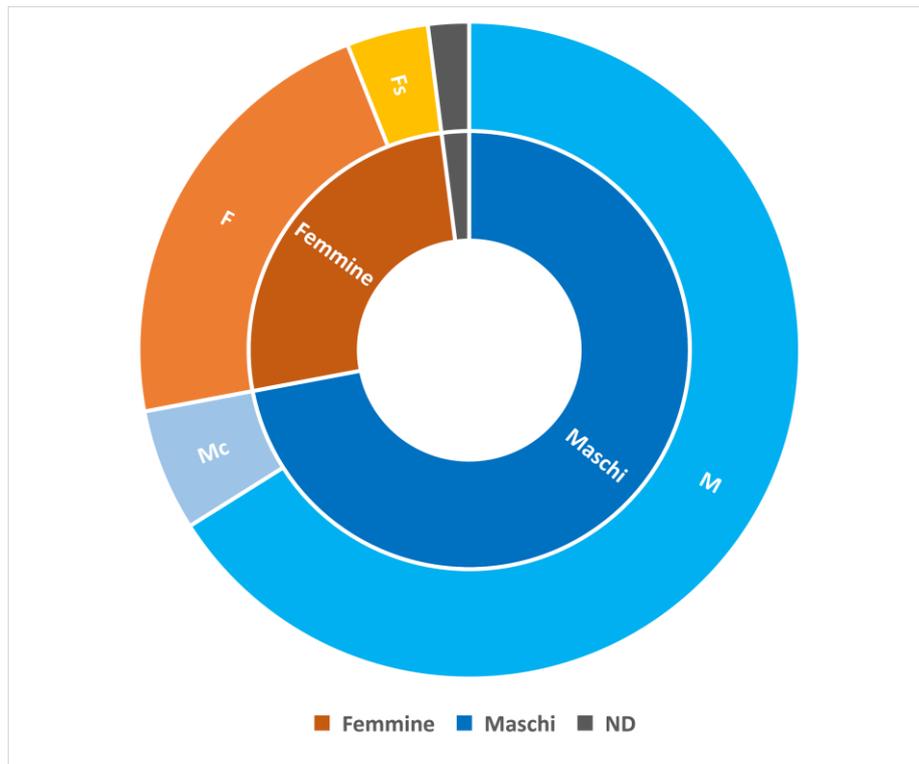


Grafico 2: I cani nella casistica dei liposarcomi erano prevalentemente animali interi di sesso maschile, con una netta minoranza delle femmine.

L'età degli animali era compresa tra 4 e 16 anni (grafico 3). Le dimensioni delle neoplasie andavano da 0,5 cm a 15 cm, con una media di 4,6 cm (grafico 4):

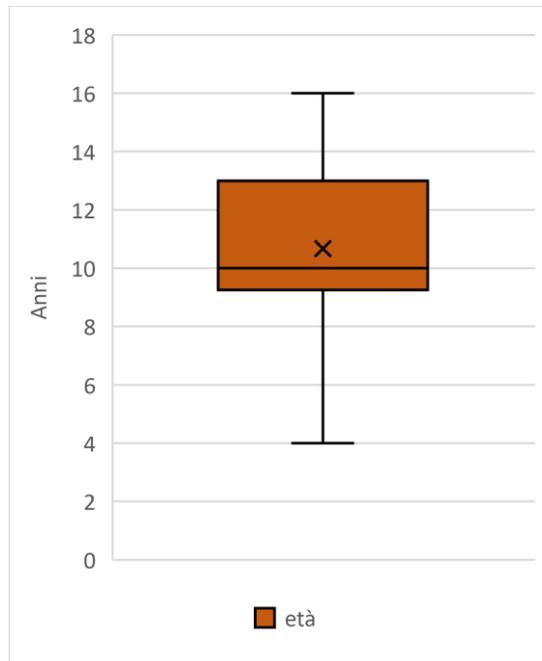


Grafico 3: Età dei cani affetti da liposarcoma, (mediana 10).

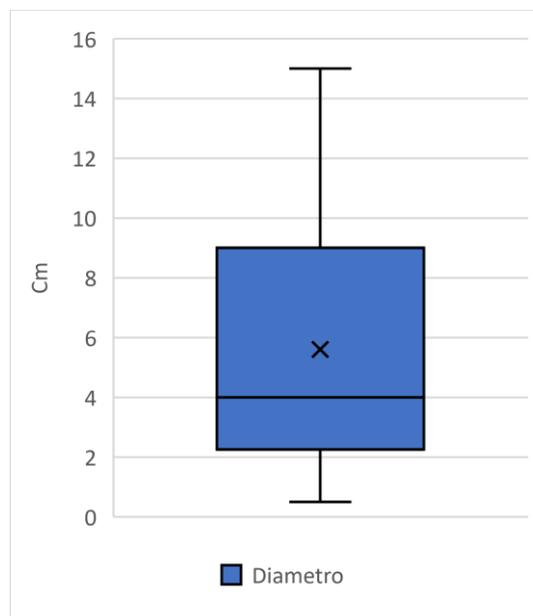


Grafico 4: Diametro dei liposarcomi di cane.

Le neoplasie erano localizzate nella maggior parte dei casi, per un totale di 37 casi su 50 a carico del sottocute nella regione del tronco e della parte prossimale degli arti, 5 casi nella porzione distale degli arti, 3 a livello splenico, 3 intramuscolari di cui 2 a carico della regione perianale ed 1 del torace, 1 intraspinale ed 1 a carico della coda (grafico 5).

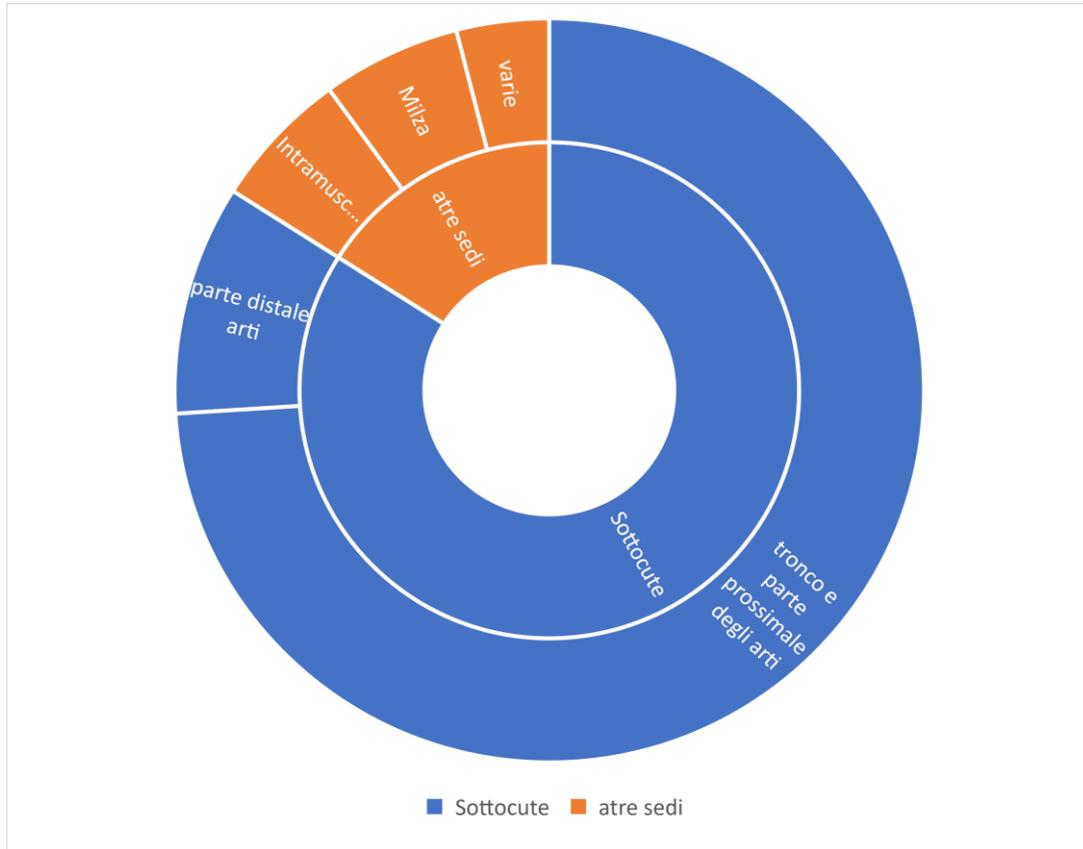


Grafico 5: distribuzione dei liposarcomi del cane nelle diverse sedi anatomiche.

La conta mitotica variava da 1 a 56, con una mediana di 5 (grafico 5) e un indice di proliferazione tra l'1.1% ed il 76.8%, con una mediana di 14.9% (grafico 6).

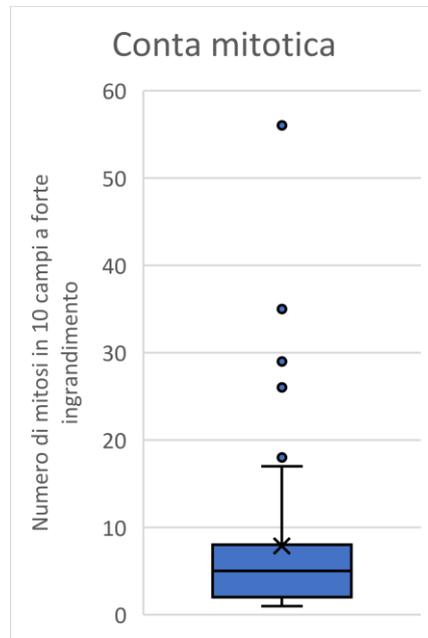


Grafico 5: Conta mitotica dei liposarcomi di cane.

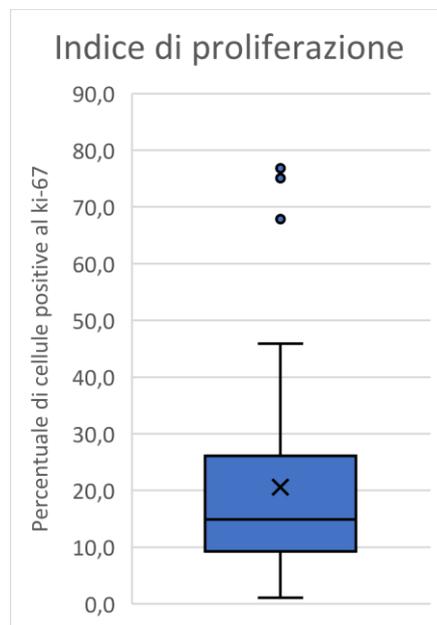


Grafico 6: indice di proliferazione dei liposarcomi del cane.

L'alta espressione di FGF2 (foto 3, 4) e FGFR1 (foto 5) è stata identificata rispettivamente in 31 casi (62%) ed in 34 casi (68%). L'espressione di PDGFB, PDGFR β e c-kit non sono state valutate rispettivamente in 1, 2 e 2 casi, perché il materiale originale è risultato insufficiente per tutte le prove. Quindi, l'espressione di PDGFB è stata valutata in 49 casi, e

quella del PDGFR β e c-kit in 48. PDGFB e PDGFR β (foto 6, 7) avevano un'alta espressione nella maggioranza dei casi rispettivamente 40 (82%) e 34 (71%) dei casi. Sei casi (31%) sono risultati c-kit positivi e 42 (87%) c-kit negativi. I dati dettagliati con l'espressione di FGF2, FGFR1, PDGF, PDGFR β e c-kit sono riportati in dettaglio nella tabella sottostante:

Numero di liposarcomi	Espressione del recettore									
	FGF2		FGFR1		PDGF		PDGFR β		c-kit	
	Alta	Bassa	Alta	Bassa	Alta	Bassa	Alta	Bassa	Alta	Bassa
Totali (50)	62%	38%	68%	32%	82%	9%	71%	29%	13%	87%
BD (14)	71%	29%	79%	21%	86%	14%	57%	43%	7%	93%
ML (7)	29%	71%	57%	43%	71%	29%	86%	14%	29%	71%
PL (25)	76%	24%	64%	36%	84%	16%	71%	29%	8%	92%
DDL (4)	0%	100%	75%	25%	67%	33%	100%	0%	33%	67%

Tabella 3: Espressione immunoistochimica di FGF2, FGFR1, PDGFB, PDGFR β , e c-kit nei liposarcomi del cane. Liposarcoma ben differenziato (BD); liposarcoma mixoide (BD); liposarcoma pleomorfo (PL); liposarcoma dedifferenziato (DDL).

Per tutti i marker valutati l'espressione era citoplasmatica. Occasionalmente all'interno della stessa neoplasia erano presenti variazioni dell'espressione anticorpale, risultando in multifocali aree negative giustapposte ad aree intensamente positive (foto 8). Lo stroma è risultato negativo con tutti i marker utilizzati (foto 9, 10), rappresentando un ulteriore controllo negativo interno ai campioni stessi. La conta mitotica aveva una correlazione negativa con l'espressione di FGF2 ($R = -0.41$; $P < 0.01$), risultando inferiore nei casi con un'alta espressione di FGF2 e correlando positivamente con l'espressione di PDGFR β ($R = 0.33$; $P < 0.01$), risultando più alta nei casi con un'alta espressione di PDGFR β . Non è stata individuata nessun'altra correlazione statistica significativa.

Discussione

Questo studio ha avuto lo scopo di indagare l'espressione di alcuni recettori tirosin-chinasici e dei loro rispettivi ligandi in 50 liposarcomi di cane. La maggior parte dei liposarcomi erano caratterizzati da un'alta espressione di FGF2, soprattutto negli istotipi ben differenziati e pleomorfi. L'espressione di FGF2 è stata riportata in numerose neoplasie canine, sia mesenchimali come l'emangiosarcoma (Yonemaru et al., 2006) ed il fibrosarcoma (Dvir and Clift, 2010), che epiteliali, come il carcinoma prostatico (Palmieri, 2015) ed il carcinoma tiroideo (Pessina et al., 2016). L'espressione di FGF2 è stata indagata anche nell'uomo nel quale è stato visto che i livelli plasmatici di questo fattore di crescita erano più alti in pazienti affetti da sarcomi dei tessuti molli rispetto ai controlli rappresentati da pazienti sani (Graeven et al., 1999; Ruka et al., 2001; Rutkowski et al., 2002). Questi dati suggeriscono che l'FGF2 può avere un ruolo nello sviluppo e nella progressione di numerose neoplasie sia nell'uomo che nel cane. In particolare, l'interesse per FGF2 è legato al fatto che potrebbe essere utilizzato come target terapeutico tramite l'utilizzo di farmaci anti-recettori tirosin-chinasici come la talidomide. Questo farmaco inibisce l'angiogenesi indotta da FGF2 (D'Amato et al., 1994), è attualmente usato nel trattamento del mieloma multiplo (Singhal et al., 1999; Barlogie et al., 2001; Pessina et al., 2016) ed è stato testato anche in altri tumori solidi dell'uomo (Kumar et al., 2004). Tuttavia, gli studi che valutano l'impatto prognostico dell'FGF2 hanno risultati contrastanti: alcuni autori sostengono che un'alta espressione di FGF2 sia associata con un più alto indice proliferativo e con una prognosi negativa (Kilvaer et al., 2011), mentre altri sostengono che ci sia una correlazione tra livelli ematici di FGF2 più alti ed un minor rischio di recidiva (Ruka et al., 2001). Questi risultati contrastanti

supportano l'ipotesi che alcuni tumori che utilizzano il *pathway* dell'FGF2 potrebbero avere un comportamento meno aggressivo (Brattström et al., 1998; Obermair et al., 1998) e che altri *pathway* più efficienti dal punto di vista oncogenetico possano supportare la proliferazione tumorale nei casi con una bassa espressione di FGF2 (Obermair et al., 1998; Brattström et al., 1998; Yoon et al., 2004). Questa ipotesi spiegherebbe anche la correlazione negativa osservata in questo studio tra l'alta espressione di FGF2 ed una conta mitotica più bassa nei casi in questione. Questo *pathway* potrebbe dunque essere meno efficiente al punto da indurre una minore proliferazione nei liposarcomi di cane che lo sfruttano come *pathway* principale, avendo così un più basso indice mitotico nei liposarcomi che hanno un'alta espressione di FGF2.

Molti casi inoltre avevano un'alta espressione di FGFR1, come riportato in letteratura veterinaria in diversi sarcomi dei tessuti molli del cane come l'emangiosarcoma (Yonemaru et al., 2006), i tumori perivascolari (Avallone et al., 2015) ed in linee cellulari di liposarcoma e fibrosarcoma di cane (Schweiger et al., 2015b). Tuttavia, in questo studio non è stata trovata una correlazione statistica tra l'espressione di FGFR1 e la conta mitotica o l'indice di proliferazione. Questo ulteriore dato suggerisce che il *pathway* FGF2-FGFR1 non è rilevante nella patogenesi del liposarcoma del cane.

Anche il c-kit non sembra essere coinvolto primariamente nella proliferazione cellulare dato che è risultato espresso solo in una minoranza dei casi esaminati, come riportato anche in medicina umana (Jung et al., 2015). Non è stata identificata inoltre alcuna correlazione tra l'espressione di c-kit e l'indice mitotico o con l'indice di proliferazione.

Contrariamente al *pathway* FGF2-FGFR1 quello mediato da PDGFB-PDGFR β potrebbe avere un ruolo importante nella progressione del liposarcoma del cane. Entrambe queste molecole avevano una più alta espressione sia di FGF2 che di FGFR1, risultando espresse in più del 70% dei campioni esaminati. L'espressione del *pathway* di PDGFB- PDGFR β è stata dimostrata in numerose neoplasie sia dell'uomo che del cane (Asa et al., 2012). Tra queste ricordiamo il carcinoma tiroideo (Mancikova et al., 2014), il glioma (Zhang et al., 2015), il carcinoma renale (Shim et al., 2015) dell'uomo ed il mastocitoma cutaneo e sottocutaneo (Thompson et al., 2016) ed il linfoma (Aricò et al., 2014) del cane. L'espressione di PDGFB e PDGFR β è stata anche descritta in neoplasie mesenchimali in diverse specie inclusi l'emangiosarcoma del cane (Asa et al., 2012) ed il sarcoma di inoculo del gatto (Katayama et al., 2004), il dermatofibroma protuberans nell'uomo (McCarthy et al., 2010), i tumori maligni delle guaine nervose (Perrone et al., 2009), il tumore fibroso solitario (Demicco et al., 2015), i tumori muscolari lisci (Palman et al., 1992) ed il liposarcoma

(Palman et al., 1992; Hoffman et al., 2013). In questo studio le cellule neoplastiche esprimevano sia il PDGFB che il PDGFR β , mentre lo stroma adiacente è risultato sempre negativo (foto 10), fattore che suggerisce che questi fattori nel liposarcoma del cane seguano un *pathway* autocrino piuttosto che paracrino. Inoltre, data l'alta espressione del PDGFR β e la conta mitotica significativamente più alta correlata a questo, il *pathway* che utilizza PDGFB- PDGFR β ha probabilmente un ruolo centrale nella progressione di queste neoplasie. Questo acquista un significato particolarmente interessante in quanto il PDGFR β è un target terapeutico in diverse neoplasie del cane tra cui il mastocitoma (Hahn et al., 2008), l'osteosarcoma (Fahey et al., 2013; Maniscalco et al., 2013) ed il linfoma epiteliotropo (Holtermann et al., 2016). Inoltre, è stato dimostrato che l'applicazione di inibitori dei recettori tirosin-chinasici riduca la crescita dei sarcomi dei tessuti molli in modelli murini riducendo sia la proliferazione delle cellule neoplastiche, che l'angiogenesi (Yoon et al., 2009). Queste terapie potrebbero rappresentare un utile trattamento terapeutico per quei sarcomi dei tessuti molli con escissioni incomplete o marginali, circostanza che concomita con una più alta incidenza di recidiva (Dennis et al., 2011), attualmente trattata con la radioterapia (Forrest et al., 2000; McKnight et al., 2000). Ulteriori studi sono necessari per confermare il ruolo del *pathway* di PDGFB-PDGFR β nello sviluppo e nella progressione del liposarcoma del cane per confermare l'efficacia della terapia con farmaci anti-tirosin-chinasici. Curiosamente, la correlazione positiva tra l'indice mitotico ed il PDGFR β e la correlazione negativa tra l'indice mitotico e l'FGF2 non correlava con altrettante variazioni dell'indice di proliferazione. Questi dati necessitano di una validazione su casistiche più ampie in studi prospettici.

Conclusioni

In questo studio abbiamo identificato l'espressione di due *pathway* tirosin-chinasici nei liposarcomi del cane: il FGF2-FGFR1 and PDGFB-PDGFR β . Il PDGFB- PDGFR β sembra essere coinvolto nella proliferazione delle cellule neoplastiche e si presenta come un ottimo candidato ad essere utilizzato come target terapeutico.

Pubblicazioni e comunicazioni congressuali inerenti

Articolo su riviste internazionali indicizzate:

- Pubblicato in Veterinary Pathology: Tyrosine Kinase Receptor Expression in Canine Liposarcoma, G. Avallone¹, V. Pellegrino¹, P. Roccabianca², E. Lepri³, L. Crippa, G⁴. Beha¹, L. De Tolla⁵, G. Sarli¹, Vet Pathol. 2017 Mar;54(2):212-217.

1.Department of Veterinary Medical Sciences (DIMEVET), University di Bologna, Ozzano dell'Emilia, Italy. 2 Department of Veterinary Medicine (DIMEVET), University of Milan, Milan, Italy. 3 Department of Veterinary Medicine, University of Perugia, Perugia, Italy. 4 Istovet, Besana Brianza, Italy. 5 Department of Pathology, School of Medicine, University of Maryland, Baltimore, MD, USA.

Questa è la versione dell'autore (bozza finale post-revisione) di un lavoro che è stato accettato per la pubblicazione in Veterinary Pathology. Le modifiche risultanti dal processo di pubblicazione, come le correzioni, la formattazione strutturale e altri meccanismi di controllo qualità potrebbero non trovare riscontro in questo documento.

Poster a congressi internazionali:

- Tyrosine kinase receptors expression in canine liposarcoma, G. Avallone, V. Pellegrino, P. Roccabianca, E. Lepri, L. Crippa e G. Sarli, ESVP, ECVP, 2nd - 5th September 2015 Helsinki, Finland.

Studio 2: Il lipoma a cellule fusate nel cane: una nuova entità

Obiettivo dello studio

Il lipoma a cellule fusate è una neoplasia adipocitaria benigna descritta nell'uomo. È un'entità rara e rappresenta una sfida diagnostica in particolare nella sua variante fat-free/fat-poor rispettivamente con lipidi scarsi o assenti (Billings and Folpe, 2007; Sachdeva et al., 2009). Nell'uomo è stato descritto e caratterizzato, ma nel cane al momento dello studio, la descrizione di questa entità era frammentaria (Gross, 2005c). Le caratteristiche che permettono la differenziazione del lipoma a cellule fusate da altri sarcomi dei tessuti molli nel cane sono scarsamente caratterizzate. Lo scopo di questo studio è stato quello di descrivere e caratterizzare le caratteristiche di 6 casi di lipoma a cellule fusate nel cane.

Materiali e metodi

➤ **Selezione casistica**

I casi descritti in questo studio provengono dai servizi di diagnostica istopatologica di due sedi universitarie distinte e sono stati selezionati sulla base del sospetto diagnostico istologico di lipoma a cellule fusate.

➤ **Esame istologico ed istochimico**

Le sezioni istologiche sono state preparate secondo metodi routinari e la valutazione della conta mitotica è stata effettuata secondo la stessa metodica riportata nello studio dei liposarcomi. Ogni caso è stato sottoposto alle seguenti colorazioni istochimiche: tricromica di Masson's, PAS (periodic acid-Schiff), e Alcian blue a pH 2.5. Un caso, di cui era disponibile del tessuto fresco, è stato sottoposto a colorazione Sudan IV per confermare la presenza intracitoplasmatica di lipidi. Per fare questo è stato congelato in isopentano, raffreddato in azoto liquido, e sono state tagliate sezioni seriali multiple di 5-7 micron di spessore al criostato.

➤ **Esame immunoistochimico**

Su tutti i casi è stato effettuato un pannello immunoistochimico con vimentina (Dako, Glostrup, Denmark), actina muscolare liscia (Dako), MDM2 (Abcam, Cambridge, UK), S100 (Dako), fattore VIII-ra (Dako), e Ki-67 (Dako). Il protocollo immunoistochimico è sovrapponibile a quanto dettagliato nella sezione relativa ai liposarcomi e l'origine, la diluizione ed il tipo di anticorpo sono riportati in tabella 4:

<u>Antigene</u>	<u>Anticorpo</u>	<u>Tipo; Specie di origine</u>	<u>Diluizione</u>	<u>Casa produttrice</u>
Vimentina	Clone V9	Monoclonale; topo	1:600	Dako
α -sma	Clone 1A4	Monoclonale; topo	1:450	Dako
MDM2	Clone 2A10	Monoclonale; topo	1:100	Abcam
S100	Z 0311	Policlonale; coniglio	1:2400	Dako
Fattore VIII-ra	A 0082	Policlonale; coniglio	1:2000	Dako
Ki-67	MIB-1	Monoclonale; topo	1:600	Dako

Tabella 4: Lista del pannello anticorpale utilizzato per i lipomi a cellule fusate del cane con origine tipo, diluizione e casa produttrice degli anticorpi.

Gli smascheramenti antigenici sono stati effettuati tramite immersione delle sezioni in tampone citrato a pH 6.0 e 2 cicli a 750 W di 5 minuti ciascuno in microonde per vimentina, actina muscolare liscia (α -sma), l'MDM2, 4 cicli per Ki-67 e incubate a 37° per S100 con soluzione enzimatica di tripsina allo 0.05% e pH 7.6 per 15 minuti e lasciati raffreddare a temperatura ambiente per 20 minuti.

Come controlli positivi sono stati utilizzati per vimentina, α -sma, MDM2 sezioni di tessuto di granulazione di cane, per S100 cartilagine matura di cane e per Ki-67 sezioni di linfonodo

iperplastico di cane. I controlli negativi sono stati ottenuti mediante l'omissione dell'anticorpo primario sulle stesse sezioni dei controlli positivi.

➤ **Indice di proliferazione**

L'indice di proliferazione è calcolato secondo la stessa metodica riportata nello studio dei liposarcomi.

Risultati

Gli animali affetti erano 2 meticci, 2 labrador retrievers, 1 pastore tedesco, ed 1 schnauzer. Due cani erano femmine intere, un maschio intero, un maschio castrato ed in un caso il sesso non era riportato in anamnesi. Gli animali avevano 13 anni in due casi, 12 anni in 3 casi e 9 in un cane, per una media di 11.8 anni ed una mediana di 12 anni. Tutte le neoplasie erano masse solitarie localizzate nel sottocute: nella regione mammaria in due casi, ed in un caso nella regione del torace, del ginocchio e sulla porzione prossimale dell'arto anteriore. In un caso non era riportata la sede. La dimensione era molto variabile, dai 2 cm fino ad 11 cm di diametro, con una media di 6,6 cm ed una mediana di 6,3 cm. Tutti i casi erano caratterizzati da una crescita espansiva e dalla presenza di una pseudocapsula. Istologicamente erano composti da cellule fusate immerse in una quantità da moderata ad elevata di matrice mixoide moderatamente alcianofilica e PAS negativa ed abbondante matrice collagene caratterizzato da fibrille di dimensioni variabili e arrangiate in maniera disorganizzata, descritto in letteratura come *ropey-collagen* (foto 11). Nelle aree con una densità maggiore le cellule sono fusate e rigonfie, con un nucleo ovale ed eccentrico e nucleolo inapparente, con occasionali vacuoli intracitoplasmatici somiglianti ad adipociti in formazione. La caratterizzazione del contenuto dei vacuoli con la conferma del loro contenuto lipidico è stata ottenuta con il Sudan IV (foto 12).

Tre casi avevano uno scarso contenuto di adipociti maturi (foto 13), presenti in meno del 10% delle cellule neoplastiche, da soli o in aggregati, rispondendo alla diagnosi di lipoma a cellule fusate *fat-poor*. Nei restanti tre casi non sono stati identificati adipociti maturi, rientrando nella sotto-classificazione di lipoma a cellule fusate *fat-free*. Tutti i casi presentavano aree con spazi irregolari fessuriformi ricordando il pattern pseudoangiomatico (foto 14) descritto nel lipoma a cellule fusate dell'uomo (Goldblum et al., 2014d). La conta mitotica in 10 campi a forte ingrandimento era 0 in 5 casi ed 1 in un caso, per una media di 0,17. In cinque casi erano presenti inoltre scarsi linfociti e

plasmacellule nella periferia della neoplasia. L'indice di proliferazione variava da 0,9% a 5,6% con una media del 2,8%. Tutti i casi erano positivi alla vimentina e negativi a S100, α -sma, fattore VIII-ra, MDM2. Le cellule che delimitavano gli spazi pseudoangiomatosi intraneoplastici sono risultate negative al fattore VIII-ra, confermando la natura non vascolare di questi spazi.

Discussione

Le principali diagnosi differenziali in questi casi includono diverse neoplasie mesenchimali di natura benigna e maligna. Tra queste ritroviamo il fibrolipoma, il lipoma atipico, il liposarcoma mixoide e il liposarcoma dedifferenziato, il fibrosarcoma, il tumore delle guaine dei nervi periferici, il leiomiosarcoma, il sarcoma miofibroblastico e la fascite nodulare.

Le caratteristiche che ci permettono di distinguere il fibrolipoma dal lipoma a cellule fusate sono che il fibrolipoma è caratterizzato dalla presenza di tessuto connettivo fibroso che si interpone tra i numerosi adipociti (Gross, 2005c), mentre il secondo ha una quantità di lipidi decisamente inferiore e le fibre collagene sono sottili, di calibro diverso con un aspetto "filamentoso", molto diverse da quello che è l'aspetto del collagene maturo.

Il lipoma atipico è invece composto da adipociti ben differenziati con rari lipoblasti atipici, ed il lipoma a cellule fusate, come già sottolineato più volte, ha una quantità di adipociti scarsa se non nulla, motivo per il quale è stato escluso.

I liposarcoma mixoide e dedifferenziato sono caratterizzati dalla presenza di lipoblasti, da vacuoli lipidi intracitoplasmatici che deformano il nucleo e da un alto indice proliferativo (Hendrick, 1998; Gross, 2005c; Avallone et al., 2016). Questi aspetti erano tutti assenti nei nostri casi, che erano invece caratterizzati da un basso o nullo indice mitotico e da un basso indice di proliferazione ed in cui la differenziazione adipocitaria era evidente solo nelle aree in cui erano presenti adipociti maturi. Inoltre tutti i casi erano negativi ad MDM2, espresso invece nel liposarcoma dedifferenziato (Avallone et al., 2016). Questi aspetti hanno permesso di escludere il liposarcoma dedifferenziato e mixoide. Il liposarcoma ben differenziato è stato escluso per l'assenza di vacuoli intracitoplasmatici e per l'abbondante matrice collagene (Gross, 2005c; Goldblum et al., 2014e).

La mancanza dell'espressione di S100, fattore VIII-ra e α -sma ha permesso di escludere l'origine perineurale, endoteliale, muscolare o miofibroblastica. In medicina umana i lipomi

a cellule fusate comprendono uno spettro morfologico che include il lipoma pleomorfo, entità caratterizzata da adipociti maturi fra cui sono occasionalmente presenti cellule multinucleate atipiche, che tuttavia non sono state riscontrate in questa casistica (Goldblum et al., 2014e). Una neoplasia con differenziazione fibrosa non può essere esclusa sulla base dell'immunoistochimica, tuttavia le caratteristiche morfologiche sono estremamente diverse. Il collagene del lipoma a cellule fusate ha fibre sottili, con diametri differenti, è lasso ed è disposto in maniera disorganizzata rispetto ad un fibroma che invece ha una cellularità minore ed una quantità di collagene superiore. Inoltre la conta mitotica e l'indice di proliferazioni bassi e la presenza di vacuoli intracitoplasmatici, anche se occasionali, non sono compatibili con una diagnosi di fibrosarcoma (Gross, 2005d).

La fascite nodulare è considerata una lesione reattiva, non tumorale del cane, composta da fibroblasti e miofibroblasti, che esprimono l'actina muscolare liscia, marcatore che non è risultato mai espresso in questa casistica. Inoltre, la fascite nodulare è caratterizzata da un occasionale aspetto a cultura cellulare delle cellule fusate che lo compongono, e da margini frastagliati (Gross, 2005d) entrambi assenti nei campioni esaminati, invece caratterizzati da una crescita espansiva e da cellule con aspetto bipolare e un nucleo centrale. Le caratteristiche istologiche descritte in questa casistica ricalcano la descrizione del lipoma a cellule fusate già caratterizzato nell'uomo (Billings and Folpe, 2007; Sachdeva et al., 2009; Goldblum et al., 2014d). L'identificazione di queste caratteristiche in questi campioni del cane porta alla diagnosi di lipoma a cellule fusate, importante per differenziarlo da altre entità con prognosi peggiori.

Conclusioni

L'identificazione di caratteristiche istopatologiche quali fasci di cellule fusate, con adipociti immaturi, occasionali adipociti maturi, in presenza di *ropey collagen* e matrice mixoide ed occasionale pattern pseudo-angiomatoso permettono di diagnosticare il lipoma a cellule fusate. È importante riconoscere e considerare questa diagnosi per evitare diagnosi erranee di sarcomi dei tessuti molli.

Pubblicazioni e comunicazioni congressuali inerenti

Articolo su rivista internazionali indicizzata:

- Spindle Cell Lipoma in Dogs, G. Avallone¹, V. Pellegrino¹, L.V. Muscatello¹, G. Sarli¹, P. Roccabianca²; Vet Pathol. 2017 Sep;54(5):792-794.

1.Department of Veterinary Medical Sciences (DIMEVET), University di Bologna, Ozzano dell'Emilia, Italy. 2 Department of Veterinary Medicine (DIMEVET), University of Milan, Milan, Italy.

Questa è la versione dell'autore (bozza finale post-revisione) di un lavoro che è stato accettato per la pubblicazione in Veterinary Pathology. Le modifiche risultanti dal processo di pubblicazione, come le correzioni, la formattazione strutturale e altri meccanismi di controllo qualità potrebbero non trovare riscontro in questo documento.

Poster a congressi internazionali:

- Spindle cell lipoma in the dog: histological diagnostic features, G. Avallone, V. Pellegrino, G. Sarli and P. Roccabianca, Annual meeting ESVP, ECVP, 7/10 settembre 2016, Bologna.

Documentazione fotografica neoplasie adipocitarie

Studio 1: espressione dei recettori tirosin-chinasici e dei rispettivi ligandi, nei liposarcomi del cane

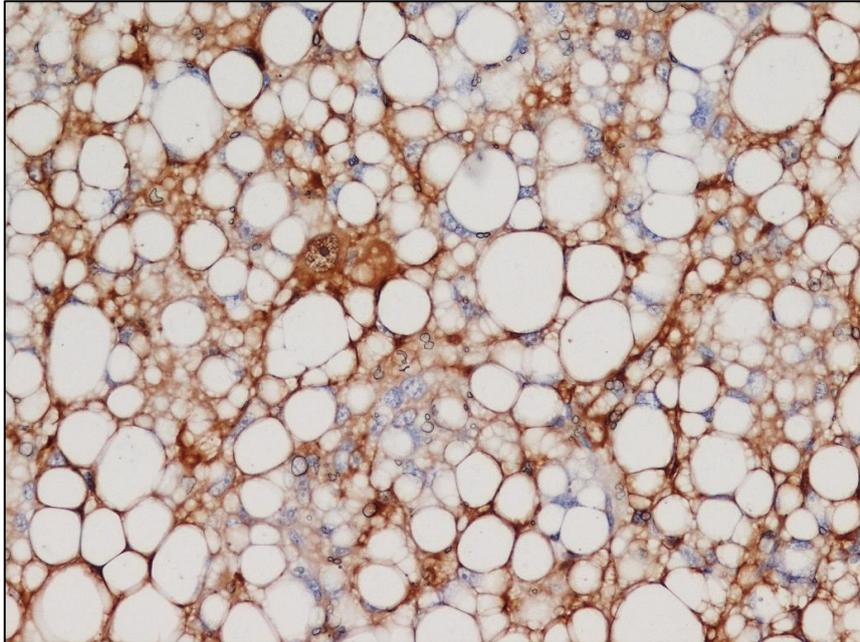


Figura 3: cane: liposarcoma ben differenziato: elevata espressione citoplasmatica di FGF2. Colorazione immunohistochimica per FGF2, cromogeno DAB, controcolorazione con ematossilina.

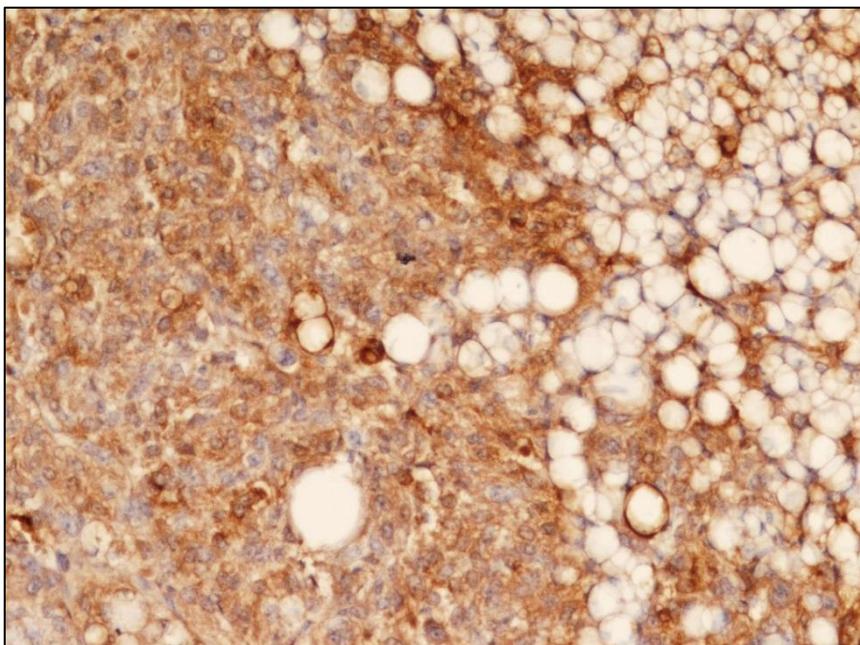


Figura 4: cane: liposarcoma ben differenziato: elevata espressione citoplasmatica di FGF2. Colorazione immunohistochimica per FGF2, cromogeno DAB, controcolorazione con ematossilina.

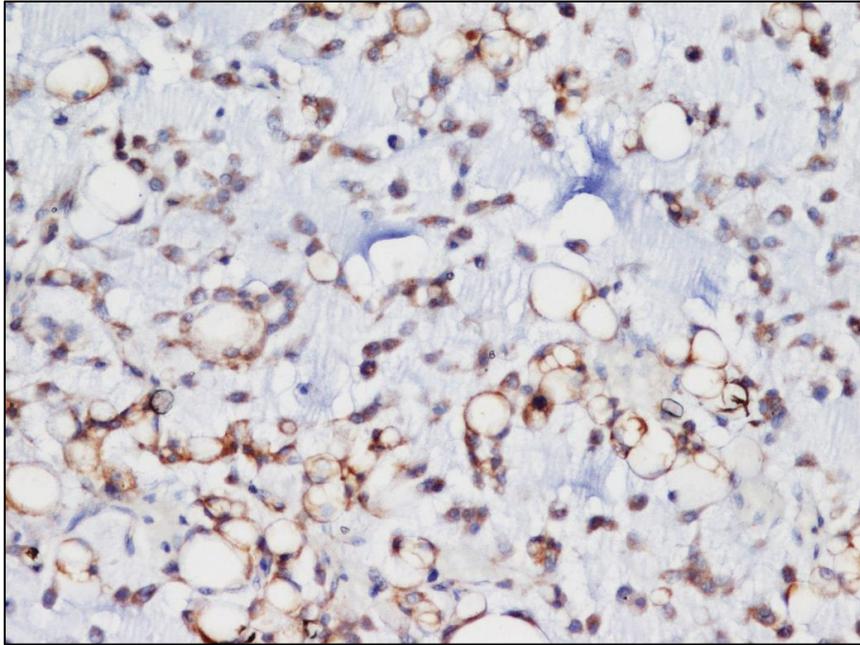


Figura 6: cane: liposarcoma mixoide. Elevata espressione citoplasmatica di FGFR1. Colorazione immunohistochimica per FGFR1, cromogeno DAB, controcolorazione con ematossilina.

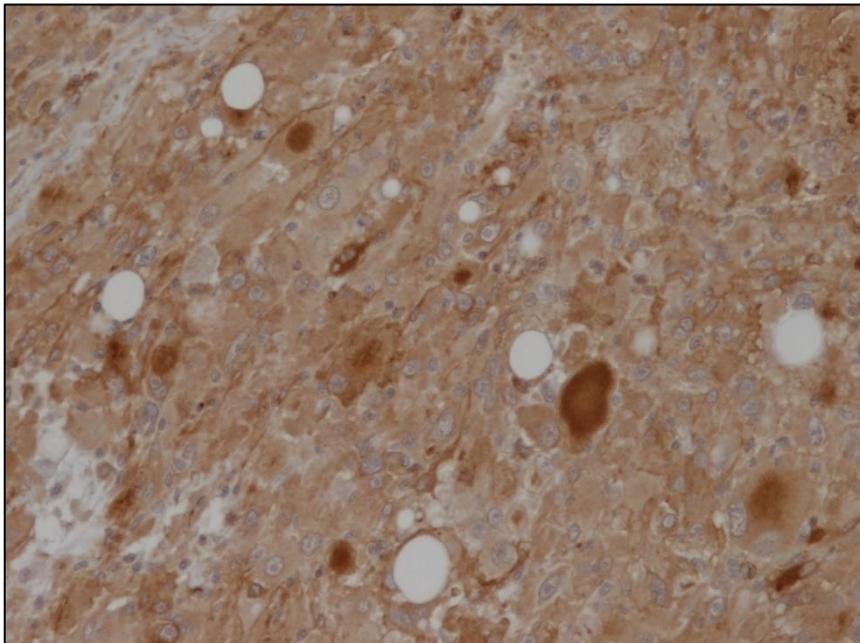


Figura 5: cane: liposarcoma pleomorfo. Elevata espressione citoplasmatica di PDGFRβ. Colorazione immunohistochimica per PDGFRβ, cromogeno DAB, controcolorazione con ematossilina.

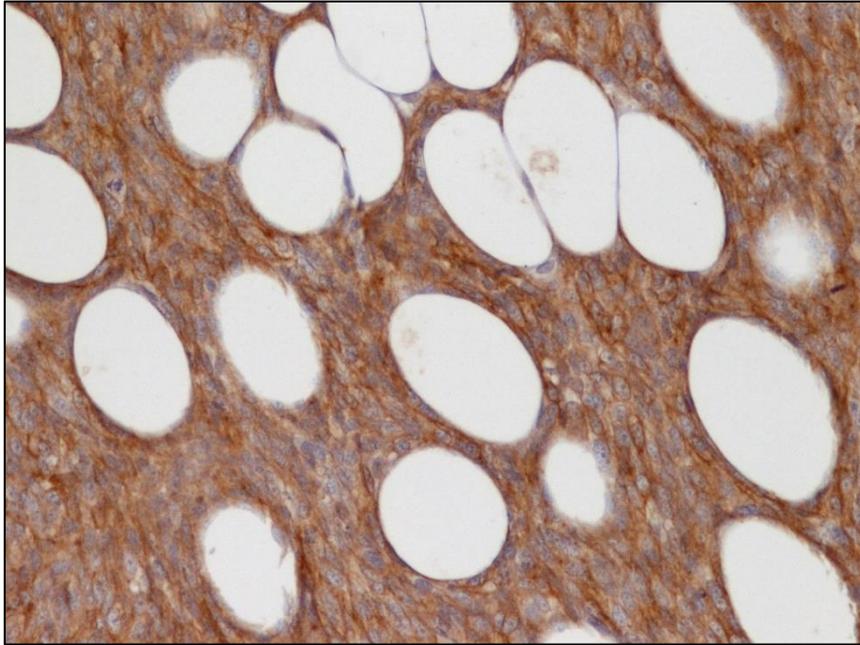


Figura 8: cane: liposarcoma dedifferenziato. Elevata espressione citoplasmatica di FGFR1. Colorazione immunohistochimica per PDGFR β , cromogeno DAB, controcolorazione con ematossilina.

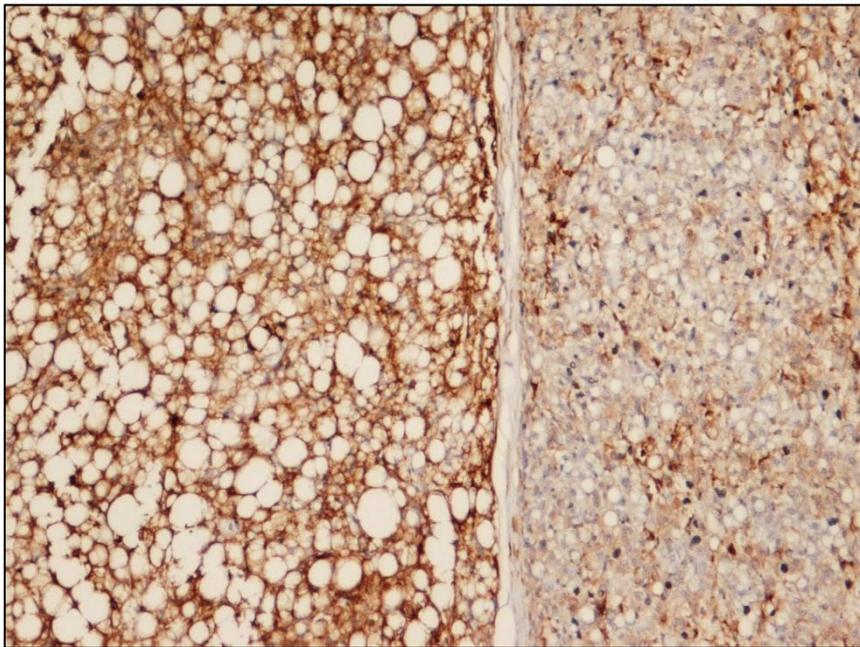


Figura 7: Cane: liposarcoma ben differenziato con elevata espressione di FGF2. lobuli neoplastici adiacenti con diversa intensità di espressione di FGF2. Colorazione immunohistochimica per FGF2, cromogeno DAB, controcolorazione con ematossilina.

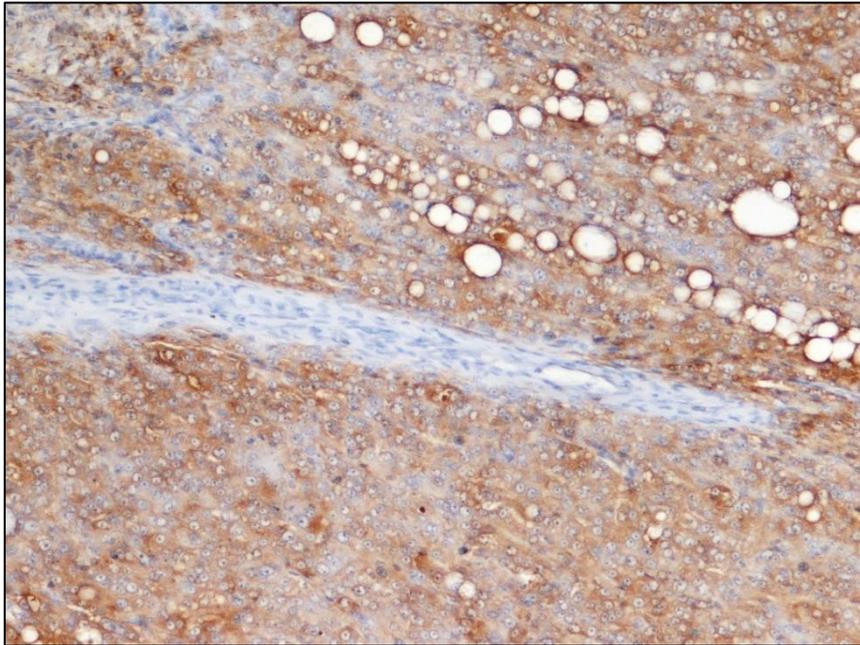


Figura 10: liposarcoma dedifferenziato con elevata espressione di FGF2. Lo stroma appare negativo. Colorazione immunohistochimica per FGF2, cromogeno DAB, controcolorazione con ematossilina.

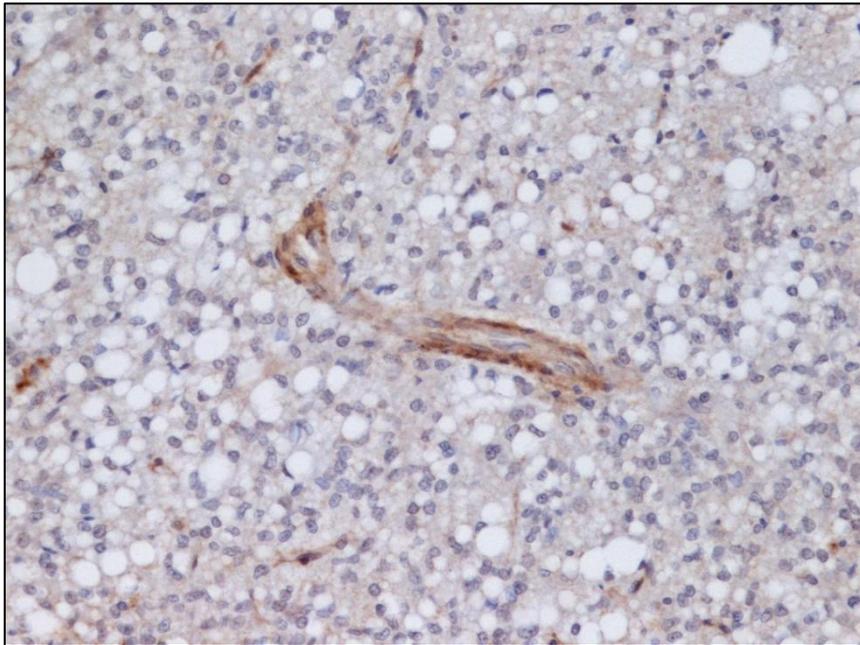


Figura 9: liposarcoma dedifferenziato con bassa espressione di FGF2. Lo stroma appare negativo. Colorazione immunohistochimica per FGF2, cromogeno DAB, controcolorazione con ematossilina.

Studio 2: Il lipoma a cellule fusate nel cane: una nuova entità

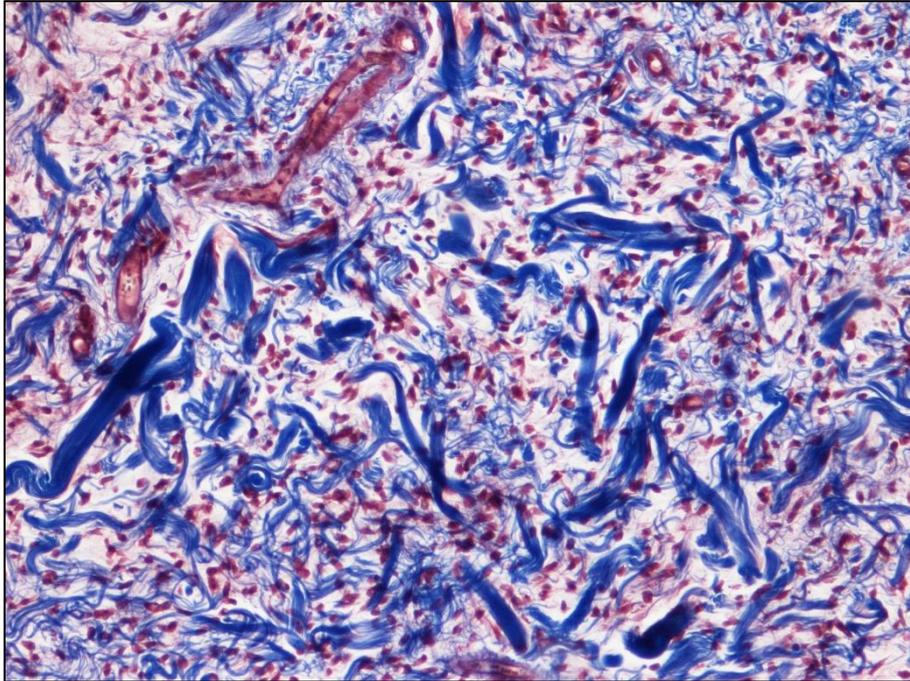


Figura 11: cane, lipoma a cellule fusate: presenza di abbondante matrice ropey collagen. Colorazione istochimica con Tricromica di Masson's.

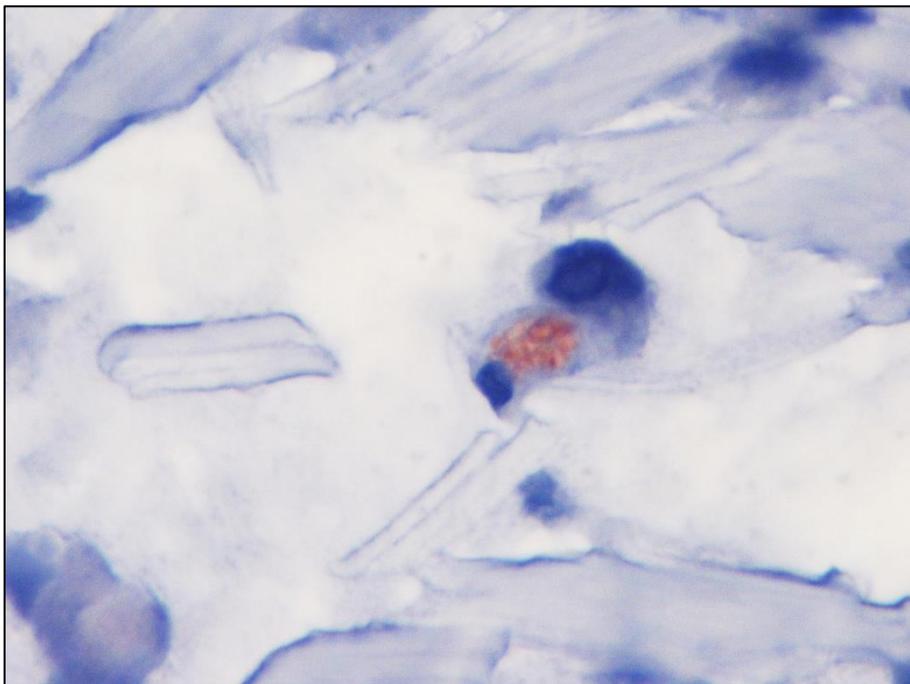


Figura 12: cane, lipoma a cellule fusate fat-poor: colorazione istochimica: dimostrazione di lipidi intracitoplasmatici in un caso di lipoma a cellule fusate fat-poor. Tessuto congelato, istochimica per Sudan IV.

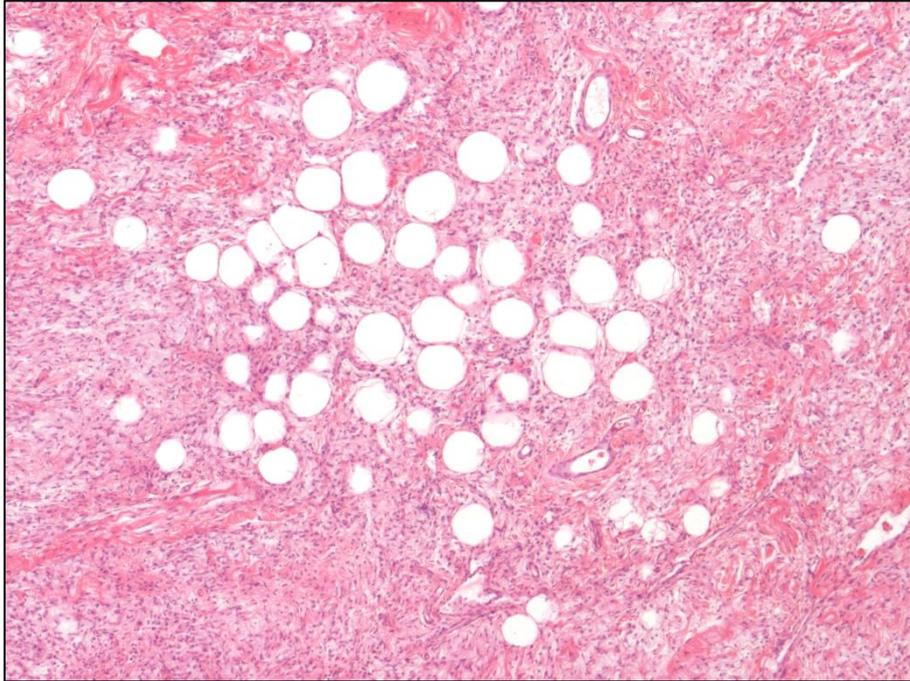


Figura 13: cane, lipoma a cellule fusate: presenza di scarsi adipociti maturi all'interno della neoplasia. Ematossilina-eosina.

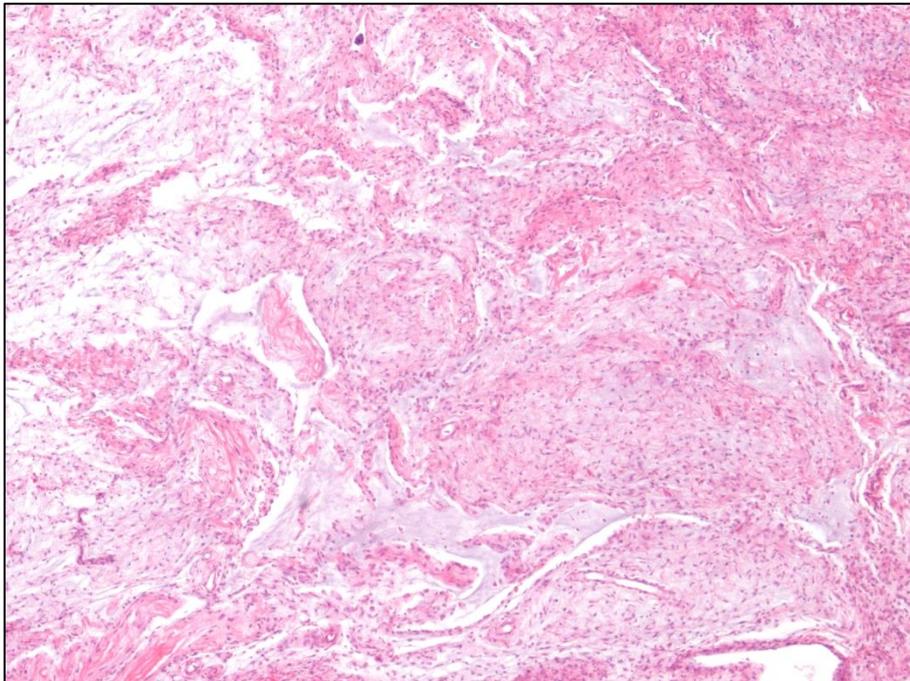


Figura 14: cane, lipoma a cellule fusate: aree fessuriformi tipiche pattern pseudo-angiomatoso descritto nell'uomo.

Neoplasie muscolari lisce dell'uomo

Neoplasie muscolari lisce benigne

Le neoplasie muscolari lisce benigne sono denominate leiomiomi e la loro distribuzione è ampia, ricalcando quella della muscolatura liscia in numerosi distretti corporei (Goldblum et al., 2014f). Sono neoplasie relativamente frequenti soprattutto a carico dell'apparato riproduttore femminile e dell'apparato gastrointestinale (Goldblum et al., 2014f; Horvai, 2015). Sedi meno colpite sono la cute, lo spazio retroperitoneale (Goldblum et al., 2014f; Horvai, 2015), e la cavità addominale. Possono avere nomenclature specifiche a seconda della localizzazione, per cui le neoplasie a carico della muscolatura vasale e del muscolo erettore del pelo vengono classificate rispettivamente come angioleiomiomi e piloleiomiomi (Horvai, 2015). Le neoplasie a carico dello spazio retroperitoneale e della cavità addominale sono più frequenti nelle donne (Miettinen, 2014), mentre quelle che originano nelle sedi più periferiche, come la coscia, gli arti ed il tronco non sembrano avere predisposizione di sesso (Kilpatrick et al., 1994). I soggetti affetti sono solitamente giovani-adulti o di media età (Billings et al., 2001; Paal and Miettinen, 2001). Queste neoplasie sono istologicamente sovrapponibili alla normale muscolatura liscia, caratterizzati quindi da fasci intersecanti di cellule fusate, ortogonali gli uni agli altri, immersi in scarsa o nulla matrice collagene. Le cellule neoplastiche sono fusate, hanno margini indistinti, abbondante citoplasma eosinofilo e nucleo centrale, allungato con margini arrotondati (Goldblum et al., 2014f).

Sono classificati a seconda della sede di origine per cui distinguiamo (Goldblum et al., 2014f):

- Leiomiomi gastrointestinali
- Leiomiomi uterini
- Leiomiomi cutanei
- Angioleiomiomi
- Leiomiomi dei tessuti molli
- Leiomiomatosi peritoneale disseminata

Leiomiomi gastrointestinali

I leiomiomi gastrointestinali possono originare in qualsiasi punto dell'apparato gastroenterico, ma sono più frequenti a livello dell'esofago (Miettinen et al., 2000) e del piccolo intestino, in particolare nel digiuno (Hauser et al., 1995; Beltran and Cruces, 2007). Per la loro diagnosi è essenziale l'immunoistochimica in quanto sono morfologicamente sovrapponibili ai tumori stromali gastrointestinali (GIST). I leiomiomi sono però positivi ad actina muscolare liscia (α -sma) e/o desmina e negativi al c-kit. I GIST invece sono positivi al c-kit, solo occasionalmente positivi all'actina, e negativi alla desmina (Miettinen et al., 2000). I sintomi sono legati alle dimensioni e alla localizzazione (Beltran and Cruces, 2007). La terapia di elezione è l'escissione chirurgica (Hauser et al., 1995; Miettinen et al., 2000; Beltran and Cruces, 2007).

Leiomiomi uterini

I leiomiomi uterini sono i tumori uterini più frequenti nella donna, rappresentando il 10% dei tumori in questa sede, e colpiscono generalmente donne nella quarta e quinta decade d'età (Oliva et al., 2014). Sono riportate numerose varianti istologiche dei leiomiomi uterini: leiomioma, leiomioma cellulare, leiomioma simplastico/con nuclei bizzarri, leiomioma mitoticamente attivo, leiomioma idropico, leiomioma apoplettico, leiomioma lipomatoso, lipoleiomioma, leiomioma epitelioido, leiomioma mixoide, leiomioma dissecante, leiomiomatosi diffusa, leiomiomatosi intravenosa e leiomioma metastatizzante (Oliva et al., 2014). Possono essere masse singole o multiple e solitamente sono demarcate, a crescita espansiva, e possono essere intramurali, submucosali o subsierosali (Oliva et al., 2014; Ellenson and Pirog, 2015). I sintomi sono estremamente variabili spaziando da menorragia, anemia, dolorabilità addominale, infertilità ed aborto (Neuwirth and Moritz, 2009; Oliva et al., 2014). Nella progressione dei leiomiomi genitali sembrano essere rilevanti gli ormoni estrogeno e progesterone. Queste neoplasie tendono ad aumentare di dimensioni durante i periodi fertili e regrediscono con la menopausa (Yang et al., 2002). È stato inoltre provato che sono espressi in maniera significativa nei leiomiomi rispetto al normale miometrio. Queste neoplasie possono avere una cellularità più elevata rispetto ai leiomiomi delle altre sedi, ed è tollerato un indice mitotico più elevato. Tra le altre caratteristiche istologiche

peculiari sono descritte occasionali aree di matrice mixoide e mineralizzazioni (Neuwirth and Moritz, 2009).

Tumori muscolari lisci con potenziale maligno incerto

Il termine “tumori muscolari lisci con potenziale maligno incerto” è stato utilizzato inizialmente per classificare le neoplasie muscolari lisce uterine che non possono essere classificate nettamente né come benigne né come maligne (Bell et al., 1994; Oliva et al., 2014). Rientrano in questo gruppo i tumori muscolari lisci in cui siano presenti meno di 10 mitosi in 10 campi a forte ingrandimento, ma sono presenti sia necrosi tumorale, che moderate atipie cellulari visibili ad un ingrandimento di 10x, oppure quando sono presenti un numero di mitosi \geq a 10 ma in assenza di atipie e necrosi. Poiché la maggior parte di queste neoplasie non recidiva (Bell et al., 1994; Ly et al., 2013) alcuni autori sono contrari alla loro nomenclatura e preferiscono chiamare le neoplasie con questo comportamento “neoplasie muscolari lisce atipiche”(Oliva et al., 2014). Sono riportate recidive dopo anni dalla chirurgia per cui è importante un lungo *follow-up* del paziente (Bell et al., 1994; Shapiro et al., 2004; Berretta et al., 2008; Ip et al., 2009). Il comportamento di questo sottogruppo è incerto e sono necessari ulteriori studi prognostici per ridurre al minimo le neoplasie che vengono così classificate (Bell et al., 1994; Oliva et al., 2014).

Leiomiomi cutanei

Si tratta di neoplasie superficiali o cutanee di due tipologie:

➤ **Piloleiomiomi**

Fanno parte di questo sottogruppo le neoplasie cutanee che originano dal muscolo erettore del pelo. Sono solitamente masse singole o multiple, spesso associate a dolorabilità (Goldblum et al., 2014f). Sono più frequenti nell'età giovane o giovane adulta ed occasionalmente nell'infanzia (Goldblum et al., 2014f). Sono inoltre presenti forme multiple legate a mutazioni della linea germinale del gene fumarato idratasi, sito nel cromosoma 1q43, codificante un enzima del ciclo di Krebs (Alam et al., 2005). Questa aberrazione

genetica è associata a leiomiomi multipli genitali della donna ed a carcinomi renali in entrambi i sessi (Alam et al., 2005).

Tipicamente i leiomiomi cutanei si sviluppano lentamente e raggiungono dimensioni di 1-2 cm di diametro. Istologicamente sono caratterizzati da un nodulo non demarcato e non capsulato, composto da fasci irregolari di cellule fusate frammiste al tessuto connettivo dermico, adiacenti al muscolo erettore del pelo, che può apparire imbrigliato nella neoplasia e sono separate dall'epidermide da una zona di tessuto normale definita *grenz zone* (Goldblum et al., 2014f). La porzione centrale è solitamente priva di fibre collagene ed è composta da fibre muscolari lisce istologicamente sovrapponibili a muscolatura liscia normale, che possono dare l'impressione di una iperplasia del muscolo erettore del pelo (Goldblum et al., 2014f).

La terapia di elezione è l'escissione chirurgica, tuttavia può risultare di difficile applicazione nel caso di leiomiomi multipli in cui una valida alternativa è rappresentata dalla laser terapia (Christenson et al., 2000; Michajłowski et al., 2015).

➤ **Leiomiomi cutanei genitali**

Questi originano a livello del derma profondo delle zone genitali quali lo scroto, il capezzolo, l'areola ed il pene, originano dalla muscolatura genitale ed hanno una frequenza doppia rispetto ai piloleiomiomi (Goldblum et al., 2014f). Istologicamente possono avere pattern e peculiarità che non sono presenti nei piloleiomiomi, quali la presenza di matrice mixoide e cellule con aspetto epitelioido (Goldblum et al., 2014f).

Leiomiomi vascolari

I leiomiomi vascolari, denominati angioleiomiomi, sono forme solitarie che solitamente originano a livello del sottocute o del derma profondo e sono composti da numerosi vasi con pareti spesse, fattore che favorisce la differenziazione istologica dai leiomiomi cutanei (Duhig and Ayer, 1959; Matsuyama et al., 2007; Goldblum et al., 2014f). Comprendono il 5% dei tumori benigni dei tessuti molli e sono più frequenti nelle donne. Sono maggiormente affette le persone anziane e si localizzano più frequentemente a carico degli arti, seguiti da testa e tronco. Solitamente non superano i 2 cm di diametro e possono inoltre essere presenti aree di matrice mixoide, ialinizzazione, calcificazione e tessuto adiposo all'interno

della neoplasia. La rimozione chirurgica è solitamente curativa (Duhig and Ayer, 1959; Matsuyama et al., 2007; Goldblum et al., 2014f).

Leiomiomi dei tessuti molli

Recenti studi sui tumori muscolari lisci a carico dei tessuti molli hanno permesso di stabilire delle caratteristiche che ci aiutano a distinguere le diverse entità in questa sede, per cui sono state identificate due categorie:

- Leiomiomi somatici: sono i leiomiomi a carico dei tessuti molli profondi degli arti e colpiscono in egual maniera entrambi i sessi. Possono arrivare a diversi cm di diametro ed andare incontro a calcificazione. La necrosi deve essere assente e la conta mitotica deve essere inferiore ad 1 in un totale di 50 campi a forte ingrandimento (HPF).
- Leiomiomi genitali: sono i più frequenti e colpiscono quasi esclusivamente le donne, in particolare nel periodo a ridosso dell'entrata della menopausa. Sono localizzati prevalentemente a livello retroperitoneale e pelvico. Macroscopicamente sono lesioni demarcate, che possono raggiungere i 10 cm di diametro e sono caratterizzati da fasci di cellule fusate con un più alto rapporto nucleo/citoplasma rispetto agli altri istotipi. Lo stroma può contenere numerosi vasi mineralizzati e possono essere presenti una quantità variabile di matrice mixoide, necrosi ischemica, e cellule con aspetto epitelioido (Goldblum et al., 2014f). Possono essere presenti lipidi intraneoplastici, che li classificano ulteriormente come lipoleiomiomi (Nayal et al., 2016). A differenza dei leiomiomi somatici possono esprimere i recettori ormonali dell'estrogeno e del progesterone (Jakimiuk et al., 2004). Questo suggerisce che possano originare da muscolatura liscia ormono-sensibile retroperitoneale. I criteri di malignità per questo sottogruppo sono approssimativamente gli stessi che vengono utilizzati per i leiomiomi uterini. In letteratura sono riportati *cut-off* diversi per le neoplasie incluse in questa categoria, i quali comprendono una tolleranza verso una conta mitotica maggiore, fino a 9 mitosi in un totale di 10 campi a forte ingrandimento (HPF) (Ly et al., 2013). Tuttavia, dati certi sul comportamento delle neoplasie con caratteristiche istologiche intermedie tra i leiomiomi ed i leiomiosarcomi non sono ancora stati determinati, per cui si tende a categorizzarle come neoplasie muscolari lisce con potenziale maligno incerto (Ly et al., 2013, Goldblum et al., 2014f). Dunque, a

seconda delle caratteristiche riscontrate e della sede alcuni autori li hanno così classificati (tab.5):

Atipia e necrosi: assenti			
Conta mitotica per 50 HPF			
<1/50 HPF	1-5/50 HPF		>5/50 HPF
Nello spazio retroperitoneale e nei tessuti molli: Leiomioma	Nello spazio retroperitoneale: Leiomioma	Nei tessuti molli: neoplasie a potenziale maligno incerto	Nello spazio retroperitoneale e nei tessuti molli: neoplasie a potenziale maligno incerto

Tabella 5: Modificato da: Goldblum et al., 2014.

Leiomiomatosi peritoneale disseminata

È una rara condizione nella quale sono presenti leiomiomi multipli o noduli simil-muscolari con localizzazione sub-peritoneale nella cavità addominale. Questa lesione è stata riscontrata unicamente nelle donne (Kökçü et al., 1994; Al-Talib et al., 2009; Goldblum et al., 2014f). In Nordamerica è stata riportata una predisposizione delle donne afroamericane. Più della metà dei casi sono riportati in corso di gravidanza ed in misura minore in individui con terapie ormonali orali e post-gravidiche. Frequentemente si tratta di un reperto occasionale, asintomatico o accompagnato da una lieve dolorabilità addominale. Le lesioni non hanno crescita infiltrante (Kökçü et al., 1994; Goldblum et al., 2014f), anche se occasionalmente è riportata una progressione maligna (Fulcher and Szucs, 1998; Sharma et al., 2004).

Neoplasie muscolari lisce maligne

Il leiomiiosarcoma è una neoplasia maligna che colpisce più frequentemente gli adulti e anziani (Goldblum et al., 2014g; Lazar et al., 2013). Rappresentano il 5% di tutti i sarcomi dei tessuti molli dell'uomo e sono riscontrati con maggior frequenza a livello retroperitoneale e pelvico e, in misura minore, a carico degli arti (Goldblum et al., 2014g; Lazar et al., 2013). Possono essere intramuscolari o sottocutanei ed originano frequentemente a carico della muscolatura vasale (Lazar et al., 2013). Queste neoplasie sono caratterizzate da un comportamento aggressivo che comprende sia le recidive locali che le metastasi a distanza. Il fattore prognostico più importante è rappresentato dalla sede e dalla grandezza del tumore, che sono strettamente correlate. Anche per le neoplasie maligne distinguiamo le diverse entità a seconda della sede di origine, per cui abbiamo:

- Leiomiiosarcomi intestinali
- Leiomiiosarcomi uterini
- Leiomiiosarcomi retroperitoneali e addominali
- Leiomiiosarcomi dei tessuti molli somatici
- Leiomiiosarcomi cutanei
- Leiomiiosarcomi di origine vascolari
- Leiomiiosarcomi di altro tipo

Leiomiiosarcomi intestinali

I leiomiiosarcomi intestinali sono neoplasie che possono originare a qualsiasi livello del tratto gastrointestinale, ma sono più frequenti a livello del colon-retto (Riddell, 2003; Miettinen et al., 2006). Hanno una morfologia variabile, da lesioni polipoidi intra-luminali a masse transmurali di dimensioni considerevoli. Sono caratterizzate da un aspetto istologico molto variabile da ben differenziati, che ricalcano la normale muscolatura intestinale, ad aspetti di sarcoma pleomorfo (Riddell, 2003; Miettinen et al., 2006). La terapia di elezione è l'escissione chirurgica ad ampi margini. Devono essere differenziati, così come i leiomiomi, dai GIST, che hanno aspetto istologico sovrapponibile (Miettinen et al., 2000; Riddell, 2003; Miettinen et al., 2006). Per questo è indispensabile sottoporli ad un pannello immunoistochimico comprendente actina muscolare liscia (α -sma), desmina e c-kit. Per essere classificati come tumori muscolari lisci devono risultare positivi ad almeno uno dei primi due marcatori e negativi al c-kit (Miettinen et al., 2000).

Leiomioidarcomi uterini

I leiomioidarcomi uterini originano dal miometrio e sono meno frequenti dei leiomioidi (Ellenson and Pirog, 2015). Contrariamente ai leiomioidi hanno un cariotipo complesso. Istologicamente hanno un indice mitotico maggiore, atipie cellulari evidenti ad un ingrandimento di 10x, ed aree di necrosi (Ellenson and Pirog, 2015). Sono frequenti in un range di età che va dai 40 ai 60 anni e recidivano frequentemente dopo la chirurgia (Ellenson and Pirog, 2015). Più della metà dei casi metastatizzano per via ematogena ad organi distanti, principalmente ai polmoni, ossa e sistema nervoso centrale. Sono riportate anche metastasi in cavità addominale. È stimata una sopravvivenza a 5 anni del 40%, che diminuisce drasticamente nei casi di neoplasie più indifferenziate fino a valori di 10%-15% (Ellenson and Pirog, 2015).

Leiomioidarcomi retroperitoneali e addominali

Circa un terzo dei leiomioidarcomi origina a livello retroperitoneale, addominale e, in misura minore, mediastinico. Due terzi dei pazienti affetti sono di sesso femminile ed hanno età avanzata (Weiss, 2002). La sintomatologia è prevalentemente legata alla compressione della massa sui tessuti circostanti (Goldblum et al., 2014g).

Queste neoplasie superano frequentemente i 5 cm di diametro, raggiungendo spesso anche i 10 cm di diametro prima di essere diagnosticati (Ranchod and Kempson, 1977; Hashimoto et al., 1985).

Leiomioidarcomi dei tessuti molli somatici

Sono neoplasie rare e non hanno prevalenze diverse a seconda del sesso (Goldblum et al., 2014g). Sono neoplasie rare, più frequenti a carico degli arti inferiori ed insorgono a livello di sottocute o muscolo. Raggiungono dimensioni inferiori rispetto ai retroperitoneali arrivando a 4-6 cm di diametro (Goldblum et al., 2014g). In un terzo dei casi originano dalla parete di vene di piccolo calibro. La prognosi è correlata alle dimensioni, al grado, ed alla localizzazione profonda (Svarvar et al., 2007).

Leiomioidarcomi cutanei

I leiomioidarcomi cutanei possono originare dal muscolo erettore del pelo o dai muscoli genitali superficiali. Si presentano come masse singole, più frequentemente a carico di cuoio capelluto (Goldblum et al., 2014g), testa e collo (Heieck and Organ, 1970) e più raramente zone genitali (Bansal et al., 2016). Sono frequenti nell'età adulta con una predisposizione degli uomini rispetto alle donne (Orellana-Díaz and Hernández-Pérez, 1983). Queste lesioni possono causare ulcerazioni del derma superficiale e dolore. Non superano di solito i 2 cm di diametro al momento della diagnosi (Spencer and Amonette, 1996; Goldblum et al., 2014g). L'eziologia di questi tumori risulta sconosciuta. In generale i leiomioidarcomi cutanei hanno un'ottima prognosi previa escissione chirurgica (Goldblum et al., 2014g). Il rischio di metastasi aumenta in concomitanza con l'invasione sottocutanea, le dimensioni del tumore ed il grado (Goldblum et al., 2014g). I dati riguardanti l'indice metastatico sono variabili ed è riportato che leiomioidarcomi cutanei abbiano un range di metastasi che va dallo 0 al 10% (Dahl and Angervall, 1974), mentre quelli che infiltrano il tessuto sottocutaneo abbiano un indice metastatico che varia dallo 0 al 40% (Dahl and Angervall, 1974; Fields and Helwig, 1981; M. L. Jensen et al., 1996). I siti di metastasi più frequenti sono i polmoni, seguiti dai linfonodi tributari (Spencer and Amonette, 1996; Goldblum et al., 2014g).

Leiomioidarcomi di origine vascolare

La distribuzione dei leiomioidarcomi che originano dalla muscolatura vasale è inversamente proporzionale alla pressione del letto vascolare. Così, il vaso che registra una maggiore incidenza è la vena cava inferiore, seguita dalle vene degli arti inferiori e dall'arteria polmonare (Spencer and Amonette, 1996; Goldblum et al., 2014g). I sintomi dipendono dalla localizzazione e dalle dimensioni e sono dovuti principalmente a danni della circolazione locale. La metà dei casi metastatizza a polmoni, fegato, linfonodi tributari o organi intra-addominali (Goldblum et al., 2014g). La terapia di elezione sarebbe l'escissione chirurgica, ma non è sempre applicabile (Goldblum et al., 2014g).

Neoplasie muscolari lisce del cane

Neoplasie muscolari lisce benigne

La muscolatura liscia è ampiamente distribuita in vari distretti anatomici, dall'apparato gastrointestinale, al tratto genitourinario, alla cute dove è associata ai follicoli piliferi nel muscolo erettore del pelo, al sistema vascolare. Le neoplasie muscolari lisce primarie possono avere dunque sedi eterogenee. In medicina veterinaria vengono classificati a seconda della sede di origine (Cooper and Valentine, 2017). Anche se le caratteristiche istologiche sono indicative di un tumore muscolare liscio per una diagnosi certa è essenziale che siano associate ad approfondimenti immunoistochimici o di microscopia elettronica (LaRock and Ginn, 1997; Russell et al., 2007; Cooper and Valentine, 2017). I leiomiomi sono masse singole, non capsulate, a crescita espansiva. Sono caratterizzati da fasci intrecciati che si intersecano a 90°, formando un cosiddetto pattern "a lisca di pesce". Le mitosi sono rare. Le neoplasie ben differenziate possono essere difficili da distinguere dalla normale muscolatura liscia, ma la presenza di una struttura nodulare ne facilita il riconoscimento (Cooper and Valentine, 2017).

Vengono così descritti i:

- Leiomiomi gastrointestinali
- Leiomiomi genitali
- Leiomiomi genitali femminili multicentrici
- Leiomiomi cutanei
- Leiomiomi splenici
- Leiomiomi della cistifellea
- Leiomiomi urinari
- Leiomiomi dell'apparato respiratorio

Leiomiomi gastrointestinali

I leiomiomi gastrointestinali colpiscono animali adulti (Culbertson et al., 1983; Patnaik et al., 1977; Bettini et al., 2003) e non hanno predisposizione di sesso (Cooper and Valentine, 2017). I chihuahua, barboni, pastori tedeschi, beagle, Labrador retrievers e Golden retrievers sembrano essere i più affetti. Le masse di dimensioni considerevoli possono dare ostruzione del tratto gastroenterico, in particolare a livello di esofago, stomaco e del colon-retto. Queste ultime due sembrano essere le sedi più colpite (Frost et al., 2003). Possono essere singoli o multipli e hanno una crescita espansiva. Non hanno tendenza a metastatizzare e la terapia di elezione è la resezione chirurgica. Possono essere associati ad ipoglicemia, sintomo che regredisce dopo l'escissione (Bellah and Ginn, 1996).

Leiomiomi genitali

Queste neoplasie sono quasi esclusive delle femmine adulte intere, anche se sono riportati rari casi nei maschi (Brodey and Roszel, 1967; Patnaik and Liu, 1975; Thacher and Bradley, 1983). Originano prevalentemente a carico di utero, cervice o vagina andando ad interferire con le normali funzioni riproduttive (Brodey and Roszel, 1967; Thacher and Bradley, 1983). Sintomi frequenti sono scoli vulvari o la protrusione della massa. Possono essere polipoidi o peduncolate, non sono infiltranti e non hanno tendenza a metastatizzare.

Leiomiomi genitali femminili multicentrici

È una sindrome caratterizzata dalla presenza di leiomiomi multipli riportata in numerose specie. Nel cane sono riportati solo pochi casi in femmine adulte intere con masse multiple a livello della vagina (Brodey and Roszel, 1967). Queste possono avere una componente fibrosa e miofibroblastica, in questo caso vengono definiti fibroleiomiomi o miofibroblastomi (Cooper and Valentine, 2017).

Leiomiomi cutanei

I leiomiomi cutanei possono originare, così come nell'uomo, dal muscolo erettore del pelo, dalla muscolatura liscia delle aree genitali o dalla tonaca muscolare dei vasi. I più frequenti sono i piloleiomiomi nella regione del dorso, del tronco seguiti da collo e testa (Liu and Mikaelian, 2003). Gli angioleiomiomi invece sono soliti originare a carico della porzione distale degli arti, incluse le dita ed i cuscinetti digitali, ma anche nella cute a livello inguinale, nella palpebra e sulla faccia (Liu and Mikaelian, 2003).

I leiomiomi cutanei possono avere tre pattern differenti (Cooper and Valentine, 2017):

- Il più comune, simile ai leiomiomi classici delle altre localizzazioni, frequente a livello della regione perineale.
- Il secondo in cui è presente un lieve pleomorfismo, presenza di cellule neoplastiche binucleate e multinucleate. Possono essere presenti vacuolizzazioni citoplasmatiche e nucleari e moderate anisocitosi ed anisocariosi.
- Il terzo pattern è composto da fasci di fibre irregolarmente arrangiati con un citoplasma debolmente eosinofilo ed il nucleo con cromatina granulare ed i margini arrotondati. Questo pattern è molto simile a quello delle neoplasie di origine nervosa.

Leiomiomi splenici

Sono neoplasie molto rare, che possono originare dalla muscolatura liscia vasale (Cooper and Valentine, 2017; Magas et al., 2018). Non è descritta predisposizione di sesso o razza (Cooper and Valentine, 2017).

Leiomiomi della cistifellea

Sono neoplasie rare, che possono essere rinvenute come reperto occasionale durante la necropsia. Non metastatizzano e l'escissione chirurgica è curativa se si mantiene l'integrità delle vie biliari (Sant'Ana et al., 2000).

Leiomiomi urinari

Sono colpiti animali adulti senza predisposizione di sesso né di razza (Heng et al., 2006). La localizzazione più frequente è rappresentata dalla parete vescicale (Norris et al., 1992; Heng et al., 2006) ed è riportato anche un caso a carico del rene (Larbcharoensub et al., 2017). Possono causare ematuria e disuria (Heng et al., 2006; Juszczuk et al., 2006) e l'escissione chirurgica è curativa (Juszczuk et al., 2006).

Leiomiomi dell'apparato respiratorio

Sono neoplasie estremamente rare. In letteratura sono riportati solo due casi di leiomiomi tracheali in animali anziani (Black et al., 1981; Bryan et al., 1981) ed un caso a carico del rinofaringe (Carpenter and Hamilton, 1995). La scarsa numerosità non permette di notare predisposizioni di sesso, razza ed età.

Neoplasie muscolari lisce maligne (leiomiosarcoma)

Nel cane, i criteri per la differenziazione i leiomiomi dai leiomiosarcomi sono una conta mitotica superiore ad 1 in 10 campi a forte ingrandimento (*HPF*), la presenza di necrosi e l'invasività (Cooper and Valentine, 2017). In particolare, non è stabilita nessuna differenza a seconda della sede di origine della neoplasia, fattore meglio caratterizzato in medicina umana. I leiomiosarcomi sono neoplasie non capsulate, frequentemente infiltranti, con un aspetto istologico abbastanza variabile, che possono avere aspetti eterogenei con aree ben differenziate o con fasci intrecciati irregolarmente e altre aree in cui le cellule si dispongono a lisca di pesce (Cooper and Valentine, 2017).

I leiomiosarcomi vengono descritti in base alla sede di origine, per cui abbiamo:

- Leiomiosarcomi gastrointestinali
- Leiomiosarcomi genitali
- Leiomiosarcomi cutanei
- Leiomiosarcomi epatici e splenici
- Leiomiosarcomi urinari

Leiomiosarcomi gastrointestinali

I leiomiosarcomi gastrointestinali sono abbastanza comuni nel cane, secondi in questa sede solo alle neoplasie di origine epiteliale. Ci sono risultati contrastanti in diversi studi sulla predisposizione di queste neoplasie negli animali di sesso femminile (Patnaik et al., 1977; Kapatkin et al., 1992; Cohen et al., 2003). È riportata una frequenza lievemente maggiore del pastore tedesco e del barbone rispetto alle altre razze (Patnaik et al., 1977). Sono più frequenti a livello del piccolo intestino ed a seconda delle dimensioni possono dare sintomi variabili da vomito, diarrea ad intussuscezioni, perforazioni intestinali e peritoniti. I dati della letteratura sul potenziale metastatico sono estremamente variabili (Kapatkin et al., 1992; Swann and Holt, 2002; Cohen et al., 2003). Si evince comunque che sono neoplasie con un potenziale metastatico variabile, con un tasso di metastasi con un range che va dal 7% al 50% (Swann and Holt, 2002). Le metastasi sono dirette principalmente ai linfonodi tributari, fegato e milza (Kapatkin et al., 1992; Cohen et al., 2003). È tuttavia necessario sottolineare che i dati presenti in letteratura, riguardo frequenza e comportamento biologico, sono

precedenti all'identificazione dei GIST nella specie canina ed è quindi probabile che i dati presenti in letteratura si riferiscano ad entrambe le entità.

Leiomiosarcomi genitali

I leiomiosarcomi degli organi genitali colpiscono quasi esclusivamente femmine intere dai 9 ai 15 anni di età, e sono descritti occasionalmente nella prostata nel cane (Hayden et al., 1999; Bacci et al., 2010). Non sono riportate predisposizioni di razza (Brodey and Roszel, 1967; Thacher and Bradley, 1983). Le localizzazioni più frequenti in cui originano sono utero e vagina (Brodey and Roszel, 1967; Thacher and Bradley, 1983). Possono causare problemi riproduttivi, ostruzione urinaria o del grosso intestino. Inoltre, quelli a carico di vulva e vagina possono andare incontro ad estese ulcerazioni (Cooper and Valentine, 2017). Le metastasi riportate in letteratura sono estremamente rare e possono coinvolgere i linfonodi addominali, i polmoni, la milza, la colonna vertebrale (Brodey and Roszel, 1967; Cooper and Valentine, 2017). I fattori che fanno propendere per una neoplasia maligna a questo livello sono la crescita infiltrante e la conta mitotica, anche se per quest'ultimo parametro non sono disponibili valori di riferimento.

Leiomiosarcomi cutanei

I leiomiosarcomi cutanei possono originare dal muscolo erettore del pelo, dalla muscolatura liscia delle aree genitali o dalla tonaca muscolare dei vasi. Sono neoplasie relativamente rare e non è stata identificata una predisposizione di sesso o razza. I piloleiomiosarcomi possono originare in qualsiasi distretto cutaneo, anche se è riportata una frequenza maggiore a livello di tronco, e più raramente sugli arti o sul tartufo (Liu and Mikaelian, 2003). Istologicamente si possono notare degli annessi cutanei intrappolati all'interno della neoplasia (Liu and Mikaelian, 2003). Gli angioleiomiosarcomi possono originare in qualsiasi distretto del corpo, ma è riportata una frequenza maggiore a carico degli arti, ed è riportato un caso a livello di palpebra ed uno a livello inguinale (Liu and Mikaelian, 2003). Entrambe le entità possono recidivare a seguito di escissioni incomplete e non sono riportate metastasi certe in letteratura (Cooper and Valentine, 2017).

Leiomiomasarcomi epatici e splenici

Sono riportati diversi casi di leiomiomasarcomi primari epatici e splenici. Gli animali affetti avevano un'età compresa tra i 7 ed i 10 anni di età, senza un'apparente predisposizione di sesso o di razza (Kapatkin et al., 1992). I segni clinici sono aspecifici andando dall'anoressia, letargia, perdita di peso, distensione addominale e diarrea. Sono neoplasie aggressive, con un alto indice metastatico che varia dal 40% al 80%, principalmente ai linfonodi intraddominali e, più raramente, ai polmoni (Johnson et al., 1989; Kapatkin et al., 1992).

Leiomiomasarcomi urinari

Sono neoplasie molto rare, che non sembrano avere predisposizione di sesso o di razza e che colpiscono animali adulto-anziani. La localizzazione principale è la muscolatura vescicale ed i sintomi che possono essere presenti comprendono ematuria, disuria, azotemia, uremia ed edema a livello della zona pelvica (Seely et al., 1978; Blackwood et al., 1992). Macroscopicamente appaiono come un inspessimento irregolare della parete vescicale che può portare ad ostruzione dello sbocco degli ureteri o dell'uretra. Possono originare anche a livello dell'uretere in cavità retroperitoneale (Berzon, 1979), o ancora a livello renale andando a sostituire il parenchima renale (Sato et al., 2003). Istologicamente possono essere presenti cellule giganti multinucleate, che possono portare ad una diagnosi errata di rhabdomiosarcoma botrioide della vescica. Le metastasi sono rare ed è riportato un caso metastatico agli organi addominali e toracici (Seely et al., 1978). La crescita infiltrante ed il sito anatomico difficilmente raggiungibile rendono difficile una chirurgia con margini puliti e questo si riflette su frequenti recidive post-chirurgia con prognosi infausta (Cooper and Valentine, 2017).

Studio 3: Validazione della tecnica dei *Tissue Micro Array* per la distinzione tra neoplasie muscolari lisce e GIST

Premessa

I Tissue Microarray (TMA) sono una tecnica che permette di risparmiare risorse e tempo, permettendo la valutazione immunohistochimica contemporanea di numerosi casi. Tuttavia, la problematica principale di questa tecnica è che vengono esaminate porzioni minime della lesione originale, per cui è necessario effettuare degli studi preliminari al fine di validare la tecnica per determinate lesioni e pannelli anticorpali specifici. Le neoplasie gastrointestinali del cane comprendono tre identità: il tumore gastrointestinale stromale (GIST), i tumori muscolari lisci ed i tumori non-GIST/non muscolari lisci. Queste neoplasie hanno un aspetto istologico sovrapponibile caratterizzate da fasci intrecciati di cellule fusate immerse in scarse fibre collagene, per cui per la loro distinzione è obbligatorio sottoporre i campioni ad un pannello immunohistochimico. La loro classificazione è basata sull'espressione dell'actina muscolare liscia (α -sma), della desmina e del c-kit. I GIST esprimono c-kit e, occasionalmente, α -sma, e sono negativi alla desmina. I tumori muscolari lisci sono positivi all' α -sma e/o positivi alla desmina e negativi a c-kit, mentre i tumori non-GIST/non-muscolari lisci sono negativi a tutti e 3 i marcatori.

Obiettivo dello studio

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia dei *Tissue Micro Array* (TMA) per il pannello immunohistochimico comprendente α -sma, desmina e c-kit applicato ai tumori gastrointestinali del cane al fine di distinguere i tumori muscolari lisci, i GIST ed i non-GIST/non-muscolari lisci, con l'obiettivo di utilizzare la suddetta tecnica per la valutazione di casistiche molto numerose.

Materiali e Metodi

➤ Criteri di selezione della casistica

I casi descritti in questo studio provengono dai servizi di diagnostica istopatologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie di Bologna e sono stati selezionati sulla base della diagnosi istologica di neoplasia gastrointestinale a cellule fusate nella specie canina. Sono stati così selezionati 34 casi.

➤ Costruzione dei TMA

Per ogni caso sono state tagliate al microtomo 4 sezioni seriali di 3 micrometri di spessore, una delle quali è stata colorata con ematossilina-eosina per la rivalutazione istologica e la selezione delle aree da campionare, e le restanti tre sono state utilizzate per l'immunoistochimica. Per costruire i TMA è stata disegnata una mappa in *Excel* (fig.15), progettando per ogni blocchetto donatore due *cores* da inserire in un blocchetto ricevente insieme ad un *core* con tessuto epatico o splenico per orientare la sezione.

Le sezioni colorate con ematossilina-eosina sono state osservate per selezionare 2 aree rappresentative (fig.16), di 3 mm di diametro, che contenessero la neoplasia e fossero prive di tessuto necrotico, infiammazione, emorragie o tessuto non neoplastico. Le aree selezionate sono state evidenziate sul vetrino e paragonate con il blocchetto donatore per identificare l'esatta area da cui campionare. È stato utilizzato un *punch* cutaneo da 3 mm di diametro per campionare le aree dal blocchetto donatore e per creare altrettanti spazi nel blocchetto ricevente (figura 17), composto da sola paraffina. I campioni così ottenuti sono stati messi nel blocchetto ricevente seguendo la mappa precedentemente creata su *Excel*. Per ogni TMA è stata preparata una sezione colorata con ematossilina-eosina per valutarne la qualità e confermare la presenza di tessuto rappresentativo (fig. 18).

Alimentari	A58	
PP1014/13	PP138/05	
PP1014/13	PP138/05	
PP284/06	PP198/05	
PP284/06	PP198/05	CTR

Figura 15: Sector map su foglio Excel: due cores per ogni campione ed un controllo positivo per orientare la sezione.



Figura 16: Selezione di due aree di 3 mm di diametro dalle sezioni intere colorate in ematossilina-eosina.



Figura 17: Blocchetto ricevente (sinistra) e blocchetto donatore (destra) a confronto.

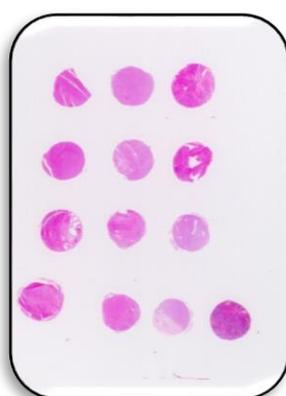


Figura 18: Controllo qualità del TMA. Colorazione in ematossilina-eosina.

➤ Immunoistochimica per α -sma, desmina e c-kit

Per ogni caso sono state tagliate al microtomo 3 sezioni seriali di 3 micrometri di spessore, sia della sezione intera che dei TMA. Queste sono state poi sottoposte a sparaffinatura e reidratate tramite passaggi seriali in alcool a concentrazioni decrescenti secondo protocolli standard. L'inibizione della perossidasi endogena è stata eseguita tramite immersione in H₂O₂ al 3% in metanolo per 30 minuti sotto cappa aspirata. Le sezioni sono poi state immerse in tampone citrato a pH 6,0 e sottoposte a 2 cicli di microonde a 750 W di 5 minuti ciascuno per lo smascheramento antigenico per gli anticorpi α -sma, c-kit (Dako, Glostrup, Denmark) e incubate a 37° per 25 minuti con tripsina allo 0,05% per la desmina (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) e lasciati poi raffreddare a temperatura ambiente per 20 minuti. L'origine, la diluizione ed il tipo di anticorpo sono riportati in tabella:

Antigene	Anticorpo	Tipo; Specie di origine	Diluizione	Casa produttrice
α -sma	1A4	Monoclonale; topo	1:450	Santa Cruz Biotech
Desmina	H76	Monoclonale; topo	1:200	Santa Cruz Biotech
CD117 (c-kit)	A4502	Policlonale; coniglio	1:200	Dako

Tabella 6: Pannello anticorpale utilizzato sui tumori gastrointestinali di cane con antigene, anticorpo, tipo, diluizione e casa produttrice

Le sezioni sono state poi incubate *overnight* e la reazione è stata poi amplificata con il metodo avidina-biotina (ABC kit elite; Vector, Burlingame, CA) e come cromogeno è stato utilizzato il 3-amino-9-ethylcarbazole (Dako). Le sezioni sono state controcolorate con l'ematossilina di Mayer, lavate in acqua corrente, e coperte con vetrino coprioggetto. Come controlli positivi sono stati utilizzati per α -sma e desmina sezioni di tessuto di intestino di cane e per c-kit sezioni di mastocitoma cutaneo di cane di cui era nota l'espressione di c-kit. I controlli negativi sono stati ottenuti mediante l'omissione dell'anticorpo primario sulle sezioni seriali dei tessuti utilizzati come controlli positivi.

➤ Valutazione dei risultati dell'immunoistochimica

Le sezioni sottoposte ad immunoistochimica sono state valutate in cieco ed i risultati riportati in un file *Excel*. Sono state quindi calcolate la specificità e la sensibilità dei TMA nell'identificare l'espressione dei tre marcatori utilizzati e nella formulazione della diagnosi di tumore muscolare liscio, GIST o sarcoma non muscolare-non GIST. Per ogni caso è stata inoltre valutata la concordanza della reattività tra i due core esaminati, per ciascun marcatore.

Risultati

Trenta casi su 34 esprimevano α -sma sulla sezione intera in maniera diffusa (fig. 19). Di questi, 28 erano positivi anche nei TMA. I due casi rimanenti erano negativi nei TMA, e sono stati interpretati come falsi negativi. Non è stato identificato nessun falso positivo per l'anticorpo in questione. La reattività dell'anticorpo in entrambi i *cores* era sempre concordante. La specificità dei TMA per l' α -sma risulta quindi del 100% e la sensibilità del 93,8%.

Ventuno casi su 34 esprimevano desmina sulla sezione intera (fig. 20), con un pattern di espressione da multifocale a diffuso. Di questi 16 sono risultati positivi anche nei TMA. 5 casi erano positivi nella sezione intera e negativi nei TMA (falsi negativi). Non è stato identificato nessun falso positivo. I due *cores* sono risultati concordanti in 30 su 34 casi. La specificità dei TMA per la desmina è stata quindi del 100% e la sensibilità dell'80,8%.

Sei casi su 34 esprimevano c-kit sulla sezione intera e nei TMA, con pattern di espressione diffuso. Non è stato identificato nessun falso positivo, né falso negativo per quest'anticorpo. I due *cores* sono risultati sempre concordanti. Sensibilità e specificità dei TMA per il c-kit sono state entrambe del 100%.

I dati in dettaglio sono elencati in tabella 7:

	α -sma	desmina	c-kit
Anticorpo	Positivo	Positivo	Positivo
Sezione intera	30/34	21/34	6/34
TMA	28/34	16/34	6/34
Concordanza tra i <i>core</i>	34/34	30/34	34/34
Sensibilità (%)	93,8	80,0	100
Specificità (%)	100	100	100

Tabella 7: Paragone tra le sezioni intere ed i Tissue Microarrays (TMA) per la valutazione immunohistochimica di 34 tumori a cellule fusate di cane a livello gastrointestinale.

Sulla base dei risultati dell'immunohistochimica delle sezioni intere 6 casi sono stati diagnosticati come GIST, 26 casi come tumori muscolari lisci e 2 casi non-GIST/non-muscolari lisci. I TMA hanno permesso così l'identificazione di tutti i GIST, di 25 su 26 tumori muscolari lisci e di 2 su 2 casi non-GIST/non-muscolari lisci. Un caso sarebbe stato diagnosticato come non-GIST/non-muscolari lisci basandosi solo sull'utilizzo dei TMA.

Discussione

I tumori a cellule fusate del tratto gastrointestinale del cane comprendono un gruppo di neoplasie con un aspetto istologico sovrapponibile che include i tumori gastrointestinali stromali (GIST), i tumori muscolari lisci ed i tumori non-GIST/non muscolari lisci (Hayes et al., 2013). Sono neoplasie caratterizzate da fasci intrecciati di cellule fusate immerse in scarsa o nulla matrice collagene (Hayes et al., 2013). L'immunoistochimica è essenziale per la loro distinzione. La classificazione si basa sull'espressione di actina muscolare liscia (α -sma), desmina e c-kit. I GIST esprimono sempre c-kit e occasionalmente possono essere positivi ad α -sma e sono sempre negativi alla desmina; i tumori muscolari lisci sono α -sma e/o desmina positivi e sempre negativi a c-kit (figura 21); i tumori non-GIST/non muscolari lisci sono negativi a tutti e tre i marcatori (Hayes et al., 2013). Questa distinzione è inoltre importante per il diverso approccio terapeutico dato che i GIST sono attualmente trattabili con farmaci anti-recettori tirosin-chinasici (Selting, 2013).

Nell'ambito della ricerca, dove si è spesso di fronte a casistiche numerose, l'utilizzo dei TMA permette un notevole risparmio, di tempo e di risorse (Parsons and Grabsch, 2009). I TMA presentano però anche dei fattori negativi che devono essere considerati nell'interpretazione dei risultati: i campioni osservati nei TMA rappresentano solo una piccola parte delle neoplasie, che possono avere pattern eterogenei, e quindi possono non essere del tutto rappresentative del campione esaminato (Wohlsein et al., 2012). Per questa ragione sono stati eseguiti numerosi studi per validare l'efficacia dei TMA per determinati campioni e specifici pannelli anticorpali in diverse neoplasie degli animali domestici, tra i quali i tumori mammari della gatta e della cagna (Muscatello et al., 2015), le neoplasie del sistema nervoso centrale dei cani (Spitzbarth et al., 2017), i tumori pancreatici insulari canini (Buishand et al., 2014), i mastocitomi (Fonseca-Alves et al., 2015) ed i linfomi nei cani (Dettwiler et al., 2013) e nei furetti (Hammer et al., 2007).

Basandosi sui risultati di questo studio si evince che i TMA hanno un'alta sensibilità e specificità nella diagnosi delle neoplasie canine del tratto gastrointestinale. In particolare, esaminando i singoli anticorpi risulta che il c-kit ha dato i risultati migliori, non avendo mai né falsi positivi né negativi. Da questo risultato si evince che è essendo la diagnosi di GIST basata sulla positività per questo anticorpo la tecnica dei TMA riesce a identificare tutti i GIST.

L'affidabilità di α -sma e della desmina è lievemente inferiore, data la presenza di alcuni falsi negativi. Per quanto riguarda la desmina questi sono probabilmente causati da un'espressione multifocale, che è stata evidenziata in alcuni casi. Quindi, la selezione di

aree neoplastiche random potrebbe portare a selezionare delle aree che non sono positive alla desmina. Per ovviare a questo problema, e ridurre quindi la presenza di falsi negativi, si potrebbero aumentare il numero di *cores* per campione andando ad aumentare quindi il numero delle aree campionate.

Per quanto riguarda l' α -sma invece è più probabile che i problemi siano dovuti ad errori procedurali durante lo svolgimento dell'immunoistochimica. A supporto di questa ipotesi c'è anche da considerare che i *cores* falsi negativi erano sempre localizzati alla periferia del TMA, fattore che potrebbe aver favorito l'essiccazione della sezione o una copertura inadeguata della sezione con i reagenti. Sono state quindi ripetute le prove con α -sma e due casi hanno dato un risultato positivo, confermando l'ipotesi di un errore procedurale.

Nonostante i falsi negativi ottenuti, per un totale di 5 casi per desmina e 2 casi per α -sma, solo un caso ha avuto una diagnosi errata di neoplasia non-GIST/non-muscolare liscia nei TMA. Infatti, l'applicazione simultanea dei due anticorpi, α -sma e desmina, che permettono l'identificazione della differenziazione muscolare, riduce la probabilità che un falso negativo possa determinare una diagnosi erronea, poiché dovrebbe verificarsi per entrambi i marcatori. Allo stesso modo, l'utilizzo per ogni caso di due *cores* previene un numero maggiore di falsi negativi, soprattutto per antigeni che sono espressi multifocalmente all'interno della neoplasia. Infatti, in 4 casi i *cores* hanno dato risultati discordanti per la reattività della desmina, cosa che con un singolo *core* avrebbe dato esito ad un falso negativo.

Conclusione

In conclusione, la costruzione di TMA di 3 mm con doppio *cores* permette la classificazione dei tumori gastrointestinali del cane nella maggioranza dei casi, permettendo la distinzione dei GIST, dai tumori muscolari lisci e dai tumori non-GIST/non muscolari lisci che sono tra i tumori più frequenti nell'apparato gastroenterico del cane. È una tecnica molto utile in quanto permette un ampio risparmio di tempo e risorse, applicabile in particolare in ambito di ricerca.

Pubblicazioni e comunicazioni congressuali inerenti

Articolo su rivista internazionali indicizzata:

- Pubblicato su Veterinary Pathology: Canine Gastrointestinal Spindle Cell Tumors Efficiently Diagnosed by Tissue Microarray-Based Immunohistochemistry, Pellegrino V¹, Muscatello LV¹, Sarli G¹, Avallone G¹. Vet Pathol. 2018 Sep;55(5):678-681.

1.Department of Veterinary Medical Sciences (DIMEVET), University di Bologna, Ozzano dell'Emilia, Italy.

Questa è la versione dell'autore (bozza finale post-revisione) di un lavoro che è stato accettato per la pubblicazione in Veterinary Pathology. Le modifiche risultanti dal processo di pubblicazione, come le correzioni, la formattazione strutturale e altri meccanismi di controllo qualità potrebbero non trovare riscontro in questo documento.

Poster a congressi nazionali:

- Validation of tissue microarray for the diagnosis of canine gastrointestinal spindle cell tumors, V. Pellegrino, L.V. Muscatello, G. Sarli, G. Avallone, Annual meeting AIPVET, LXXI convegno SISVET 28 giugno, 1 luglio 2017, Napoli, Italia.

Studio 4: Neoplasie muscolari lisce del cane: la sottile linea tra benigno e maligno

Obbiettivo dello studio

In letteratura veterinaria gli studi relativi ai tumori muscolari lisci del cane sono scarsi. Dati più accurati sono presenti invece in letteratura umana, dove i criteri di malignità sono meglio definiti. Lo scopo dello studio è stato di identificare dei parametri che aiutino a discriminare le neoplasie muscolari lisce benigne e maligne nel cane.

Materiali e metodi

➤ **Criteri di selezione della casistica**

I casi descritti in questo studio provengono dai servizi di diagnostica istopatologica di due sedi universitarie distinte e sono stati selezionati sulla base del sospetto diagnostico istologico di tumori muscolari lisci nella specie canina senza distinzione di sede di insorgenza. La casistica è stata quindi selezionata sulla base delle caratteristiche istologiche e infine sottoposta ad immunoistochimica per confermare la natura muscolare liscia delle neoplasie.

➤ **Immunoistochimica**

Su tutti i casi con caratteristiche istologiche compatibili con neoplasie muscolari lisce è stato applicato un pannello immunoistochimico con anticorpi anti-actina muscolare liscia (α -sma), -desmina e -c-kit allestendo i campioni secondo la tecnica TMA descritta nella sezione precedente. Le lesioni di diametro inferiore ad 1 cm sono state valutate sulla sezione intera. I casi di cui è stata confermata la differenziazione muscolare liscia sono stati ammessi all'immunoistochimica per Ki-67 che è stata effettuata su sezione intera. Per ogni caso sono state tagliate al microtomo 3 sezioni seriali di 3 micrometri di spessore. Queste sono state sottoposte a sparaffinatura e reidratate tramite passaggi seriali in alcool a concentrazioni decrescenti secondo protocolli standard. L'inibizione delle perossidasi endogene è stata eseguita tramite immersione in H₂O₂ al 3% in metanolo per 30 minuti sotto cappa aspirata. Le sezioni sono poi state immerse in tampone citrato a pH 6,0 e sottoposte a 2 cicli di microonde a 750 W di 5 minuti ciascuno per lo smascheramento antigenico per gli anticorpi

α -sma, c-kit, 4 cicli per Ki-67 e incubate a 37° per 25 minuti con tripsina allo 0,05% per la desmina e lasciate poi raffreddare a temperatura ambiente per 20 minuti. L'origine, la diluizione ed il tipo di anticorpo sono riportati in tabella:

Antigene	Anticorpo	Tipo; Specie di origine	Diluizione	Casa produttrice
α -sma	1A4	Monoclonale; topo	1:450	Santa Cruz Biotech
Desmina	H76	Monoclonale; topo	1:200	Santa Cruz Biotech
c-kit	A4502	Policonale; coniglio	1:200	Dako
Ki-67	MIB-1	Monoclonale; topo	1:600	Dako

Tabella 8: Pannello anticorpale utilizzato sui tumori a cellule fusate di cane con antigene, anticorpo, tipo, diluizione e casa produttrice.

Le sezioni sono state poi incubate *overnight* e la reazione è stata amplificata con il metodo avidina-biotina (ABC kit elite; Vector, Burlingame, CA) e come cromogeno è stato utilizzato il 3-amino-9-ethylcarbazole (Dako). Le sezioni sono state controcolorate con l'ematosilina di Mayer, lavate in acqua corrente, e coperte con vetrino coprioggetto. Come controlli positivi sono stati utilizzati per α -sma e desmina sezioni di tessuto di intestino di cane, per c-kit sezioni di mastocitoma cutaneo di cane di cui era nota l'espressione di c-kit e per Ki-67 sezioni di linfonodo iperplastico di cane. I controlli negativi sono stati ottenuti mediante l'omissione dell'anticorpo primario sulle sezioni seriali dei campioni utilizzati come controlli positivi.

➤ Valutazione dell'indice di proliferazione

Sulle sezioni testate con il Ki-67 è stato valutato l'indice di proliferazione. Per ogni caso sono state selezionate ed acquisite 10 immagini a forte ingrandimento delle aree con maggior attività proliferativa. Tramite software d'analisi d'immagine *ImageJ 1.48*, usando la funzione conta manuale per la conta cellulare sono state contate le cellule positive e negative al Ki-67. Per ogni caso è stata calcolata la percentuale di cellule positive sul totale delle cellule presenti nei campi selezionati per un minimo di 1000 cellule per caso.

➤ Diagnosi di benignità e malignità

Ogni caso è stato valutato sia secondo i criteri di medicina veterinaria che umana. I criteri di medicina veterinaria prevedevano come possibili diagnosi finale leiomioma o leiomiosarcoma. La diagnosi di leiomiosarcoma è stata formulata in presenza di uno dei

seguenti parametri: una conta mitotica in 10 campi a forte ingrandimento (equivalente all'area di 2,37 mm²) ≥ 1 , la presenza di necrosi e l'invasività (Cooper and Valentine, 2017). I criteri di medicina umana prevedevano invece come diagnosi finali: leiomioma, neoplasia muscolare liscia a potenziale maligno incerto (UMP), e leiomiosarcoma. In umana vengono utilizzati criteri differenti a seconda del sito di origine della neoplasia. Per le neoplasie extra-genitali i parametri che permettono la diagnosi di leiomiosarcoma sono:

- qualsiasi attività mitotica (figura 22).
- atipie nucleari più che lievi visibili ad un ingrandimento di 10x (figura 23).
- necrosi delle cellule tumorali (figura24) (da distinguere dalla necrosi ischemica).

La necrosi tumorale è multifocale, ha margini frastagliati e netti, è bordata da un margine ipercellulare e basofilo più evidente rispetto al centro necrotico e non è solitamente associata ad emorragia e infiammazione. La necrosi ischemica è dovuta all'ischemia centrale dovuta alla grandezza della neoplasia, è infatti localizzata al centro della stessa, ha margini lineari e non presenta la porzione ipercellulare adiacente alla periferia della necrosi (Lim et al., 2013). Per i casi localizzati a livello genitale invece i criteri di malignità sono diversi. Le neoplasie vengono classificate come (Bell et al., 1994, Ly et al., 2013):

- Leiomiomi se:
 - Conta mitotica fino a 9
 - Assenza di necrosi delle cellule tumorali
 - Assenza di atipie nucleari
- Neoplasie a potenziale maligno incerto
 - Conta mitotica fino a 9
 - Presenza o di necrosi tumorale o di atipie cellulari
 - O
 - Conta mitotica > 9
 - Assenza di necrosi delle cellule tumorali e di atipie nucleari
- Leiomiosarcomi
 - Conta mitotica > 9
 - Presenza di necrosi o/e presenza di atipie nucleari

Follow-up

È stato stilato ed inviato il questionario che segue ai veterinari referenti, al fine di ottenere informazioni sul decorso dei casi ammessi allo studio:

INDAGINE SUL COMPORTAMENTO BIOLOGICO DELLE NEOPLASIE MESENCHIMALI DEL CANE	
1. Per evitare errori di compilazione, ti chiediamo di indicare nuovamente il numero di istologico relativo al caso in oggetto (numero che trovi nella mail che ti è stata inviata).	Fare clic o toccare qui per immettere il testo.
2. La lesione ha recidivato?	
a. <input type="checkbox"/> Sì	
b. <input type="checkbox"/> No	
c. <input type="checkbox"/> Perso al follow up	
3. Se hai risposto sì alla domanda 2, quanti mesi dopo la chirurgia è stata diagnosticata la recidiva?	Fare clic o toccare qui per immettere il testo.
4. Se hai risposto sì alla domanda 2, come è stata confermata la recidiva?	
a. <input type="checkbox"/> Esame istologico	
b. <input type="checkbox"/> Esame citologico	
c. <input type="checkbox"/> Sola diagnostica per immagini	
d. <input type="checkbox"/> Solo esame clinico	
e. <input type="checkbox"/> Altro (specificare): Fare clic o toccare qui per immettere il testo.	
5. La lesione ha causato metastasi?	
a. <input type="checkbox"/> Sì	
b. <input type="checkbox"/> No	
c. <input type="checkbox"/> Perso al follow up	
6. Se hai risposto sì alla domanda 5, quanti mesi dopo la chirurgia è stata diagnosticata la metastasi?	Fare clic o toccare qui per immettere il testo.
7. Se hai risposto sì alla domanda 5, come è stata confermata la metastasi?	
a. <input type="checkbox"/> Esame istologico	
b. <input type="checkbox"/> Esame citologico	
c. <input type="checkbox"/> Sola diagnostica per immagini	
d. <input type="checkbox"/> Solo esame clinico	
e. <input type="checkbox"/> Altro (specificare):Fare clic o toccare qui per immettere il testo.	
8. Il paziente è ancora in vita?	
a. <input type="checkbox"/> Sì	
b. <input type="checkbox"/> No	
c. <input type="checkbox"/> Perso al follow up	
9. Se hai risposto no alla domanda 8, quanti mesi dopo la chirurgia è morto il paziente?	Fare clic o toccare qui per immettere il testo.
10. Se hai risposto no alla domanda 9, qual è stata la causa della morte del paziente?	
a. <input type="checkbox"/> La neoplasia	
b. <input type="checkbox"/> Una neoplasia diversa da quella oggetto di questo questionario	
c. <input type="checkbox"/> Una causa non neoplastica	
d. <input type="checkbox"/> Non conosco la causa della morte del paziente	

Risultati

Sono stati inclusi nello studio un totale di 105 casi. Degli animali affetti 71 erano femmine, di cui 14 sterilizzate e 32 erano maschi, di cui 9 castrati e di 2 il sesso non era presente in anamnesi (grafico 7).

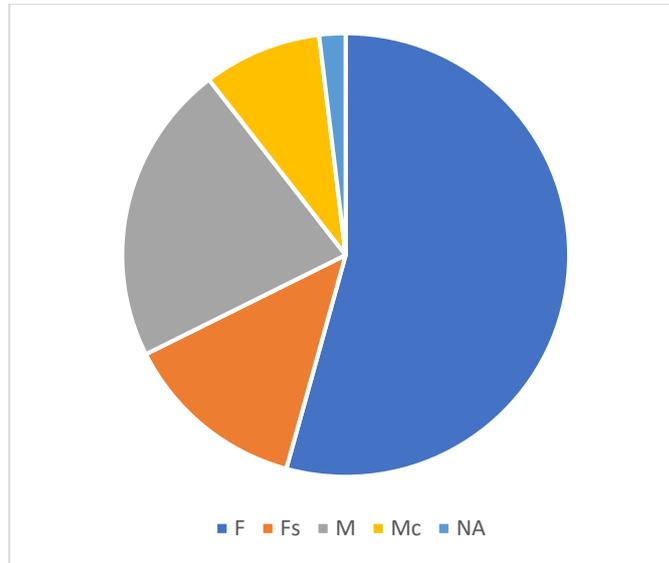


Grafico 7: suddivisione percentuale del sesso degli animali affetti da tumori dei tessuti molli per un totale di 105 casi.

L'età degli animali era compresa in un range da 3 a 15 anni, con una media di 10,5 anni (grafico 8).

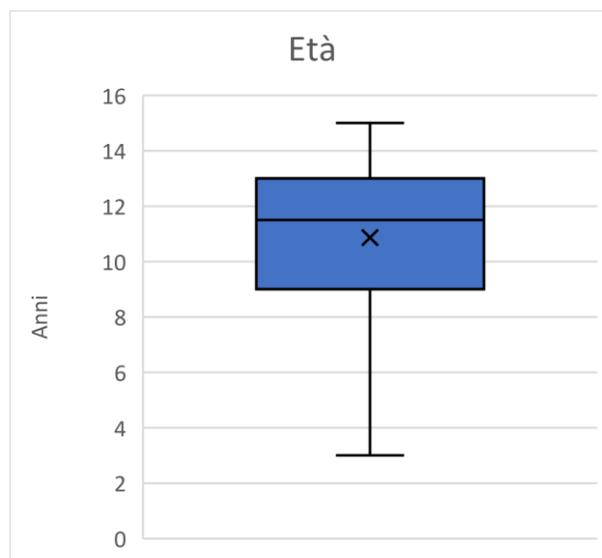


Grafico 8: Età dei cani affetti da tumori muscolari lisci.

Le dimensioni delle neoplasie andavano da 0,5 cm a 15 cm, con una media di 4,6 cm. Le neoplasie \geq a 10 cm erano 9, di cui 5 a livello genitale, 2 a livello gastroenterico, uno a carico della milza ed una a carico dei tessuti molli.

Le neoplasie erano così suddivise in base alle sedi (grafico 9): 44 genitali, 23 alimentari, 21 nei tessuti molli, 11 urinari, 4 splenici e 2 in altre sedi.

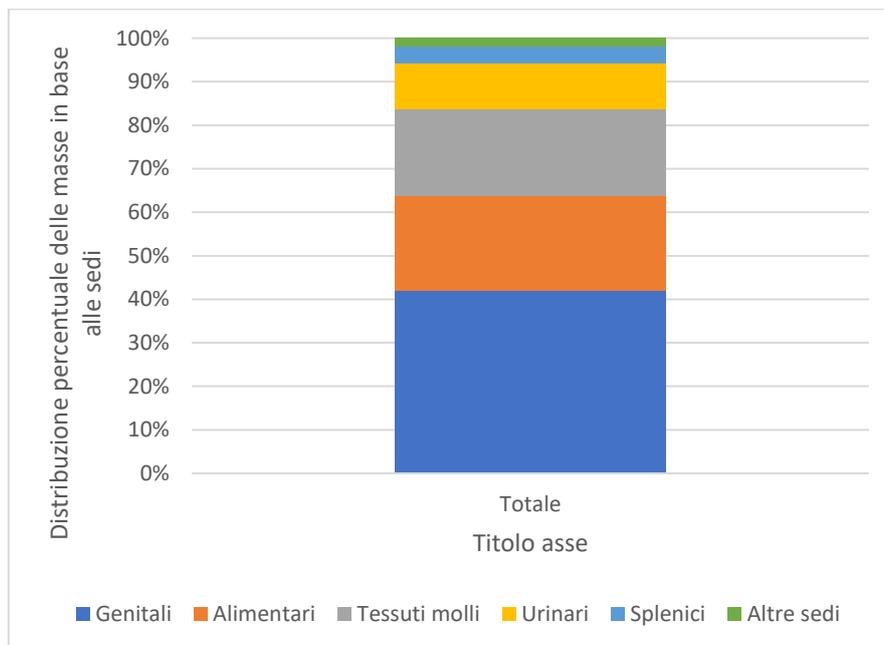


Grafico 9: Distribuzione dei tumori dei tessuti molli nei diversi distretti corporei.

Le razze più rappresentate erano 41 meticci, seguiti rispettivamente da 6 Boxer, 6 Golden Retriever e 6 Labrador.

Con i criteri di medicina veterinaria attualmente utilizzati (Cooper and Valentine, 2017) sono stati diagnosticati un totale di 22 leiomiomi e 83 leiomiosarcomi.

Seguendo invece i criteri di medicina umana stati diagnosticati 42 leiomiomi, 52 leiomiosarcomi, e 11 UMP.

A seconda della sede i principali motivi di riclassificazione sono stati diversi:

➤ Da leiomiosarcoma a leiomioma (20 casi):

Dieci casi genitali erano stati classificati come leiomiosarcoma secondo i criteri veterinari a causa della conta mitotica > 1 . Poiché la conta mitotica era inferiore a 10, e data l'assenza di necrosi ed atipie cellulari, i casi sono stati riclassificati come leiomioma data la più alta tolleranza alla presenza di mitosi nelle neoplasie genitali.

Dieci casi, con conta mitotica pari a 0, assenza di atipie cellulari erano stati diagnosticati come leiomiomi per la presenza di necrosi. Poiché tale necrosi era solo di tipo ischemico, e pertanto tollerata, queste neoplasie sono state riclassificate come leiomiomi indipendentemente dalla sede di insorgenza. Cinque di questi casi erano genitali e 5 extra-genitali.

➤ Da leiomiosarcoma a neoplasia a potenziale maligno incerto (11 casi):

Sono stati riclassificati come neoplasie a potenziale maligno incerto a causa della necrosi un totale di 10 casi. Questi erano a sede genitale, avevano un indice mitotico inferiore a 10 e la presenza di necrosi (non di tipo ischemico), in assenza di atipie cellulari. Queste caratteristiche ne hanno permesso la riclassificazione da leiomiosarcomi a neoplasie a potenziale maligno incerto.

Un caso a livello genitale era caratterizzato da un indice mitotico superiore a 10 (13 mitosi in 10 campi a forte ingrandimento) in assenza di atipie cellulari e necrosi. Essendo localizzato nel tratto genitale, è stato quindi riclassificato come neoplasia a potenziale maligno incerto.

	Riclassificati come			
	leiomioma		neoplasia a malignità incerta	
	mitosi	necrosi	mitosi	necrosi
leiomiosarcomi genitali	10	5	10	1
leiomiosarcomi extra-genitali	0	5	0	0

Tabella 9: Cause di riclassificazione dai criteri di veterinaria a quelli di medicina umana dei tumori muscolari lisci del cane.

Riassumendo, un totale di 31 leiomiosarcomi sono stati riclassificati: come leiomiomi in 20 casi e come neoplasie a potenziale maligno incerto in 11. Le riclassificazioni coinvolgevano 26 casi genitali e 5 casi extra-genitali. Il numero di leiomiosarcomi genitali era di 32 con i criteri veterinari e solo 6 con i criteri di medicina umana.

Otto delle 9 neoplasie con diametro superiore a 10 cm sono state classificate come leiomiosarcomi ed una come leiomioma con i criteri di medicina veterinaria. Con i criteri di medicina umana invece le cinque appartenenti all'apparato genitale sono state riclassificate: tre come leiomiomi e due come neoplasie muscolari lisce a potenziale maligno incerto.

Per quanto riguarda l'indice di proliferazione le neoplasie avevano un range da 0,0 a 44,0 con una media di 5,4 (mediana 3,1). Seguendo i criteri di medicina veterinaria i leiomiomi avevano un indice di proliferazione che varia da 0,0 a 7,6 con una media di 1,8 (mediana 1,1) ed i leiomiosarcomi da 0,0 a 44,4 ed una media di 6,3 (mediana 3,6).

Seguendo i criteri di medicina umana i leiomiomi avevano un indice di proliferazione che andava da 0,0 a 7,6 con una media di 2,2 (mediana 1,5). Le neoplasie muscolari lisce a potenziale maligno incerto avevano un range da 0,0 a 7,5 con una media di 2,1 (mediana 0,6). I casi diagnosticati come leiomiosarcomi con i criteri di medicina umana avevano un range da 0,0 a 44,4 con una media di 8,6 (mediana 5).

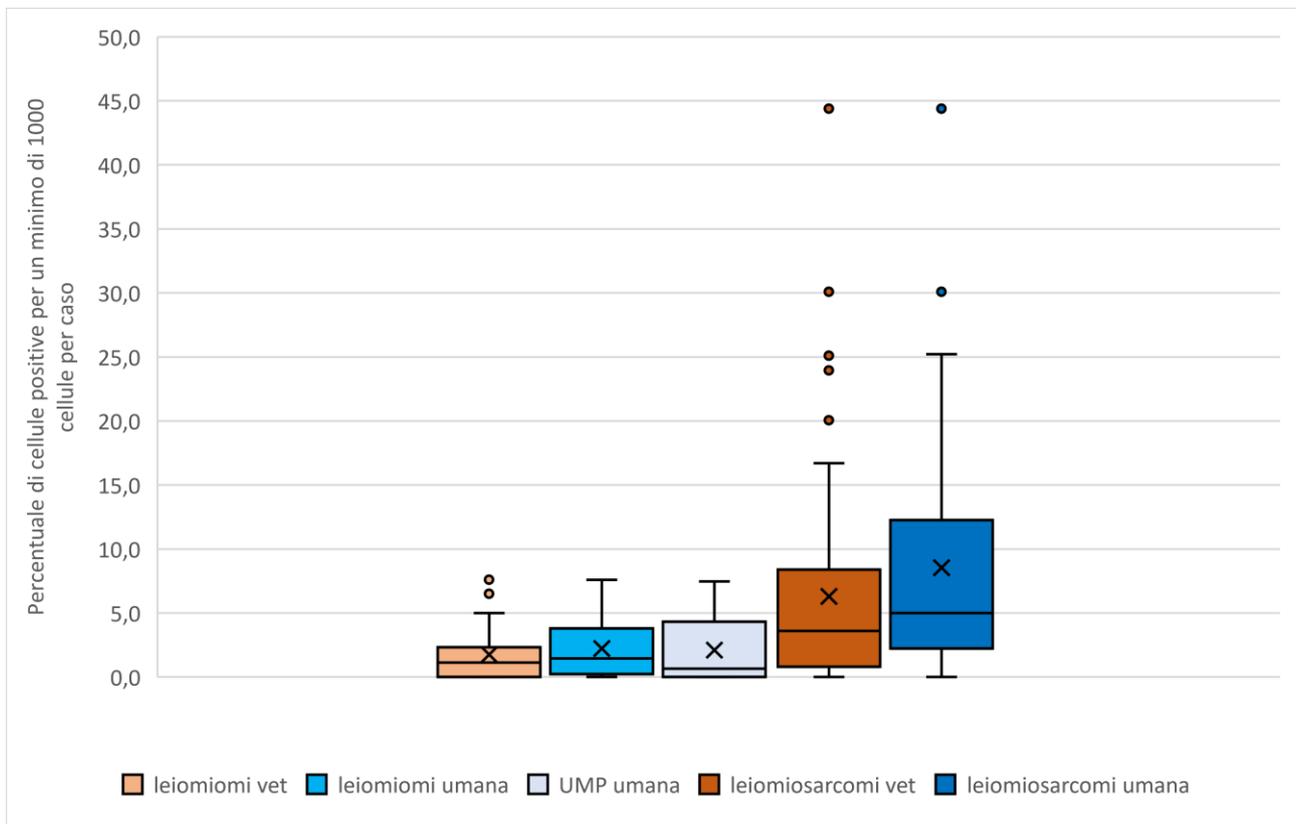


Grafico 10: Valutazione dell'indice di proliferazione delle neoplasie muscolari lisce del cane valutate con i criteri di medicina veterinaria ed umana a confronto.

Per quanto riguarda la raccolta dei dati di *follow-up* tramite questionario è tuttora in corso. I questionari raccolti ammontano a 25. Cinque soggetti sono deceduti a causa della neoplasia, 6 sono deceduti per altra causa, 9 sono ancora in vita al momento della raccolta dei dati e di 5 non si è riusciti ad avere informazioni perché non più in cura dai veterinari curanti. Dei 5 casi deceduti a causa della neoplasia 2 soggetti hanno sviluppato metastasi epatiche, in un caso c'era un sospetto di metastasi al sistema nervoso centrale, 2 casi hanno avuto recidive locali non trattabili.

Discussione

Questo studio ha avuto lo scopo di analizzare i criteri attualmente in uso in medicina veterinaria e medicina umana per discriminare le neoplasie muscolari lisce benigne e maligne nel cane. Lo scopo ultimo non è classificativo in quanto tale, ma serve a identificare dei parametri che aiutino a individuare un comportamento biologico e che siano quindi utili al paziente, al veterinario ed al proprietario ai fini prognostici, terapeutici e di qualità di vita dell'animale. La letteratura umana ha il vantaggio di accedere a casistiche più ampie, e di avere dei *follow-up più* a più lungo termine e più dettagliati. Questo comporta l'accesso ad una quantità nettamente superiore di informazioni rispetto alla medicina veterinaria, e può servire come linea guida per indagare i comportamenti di alcune neoplasie. Nel caso delle neoplasie muscolari lisce, in medicina umana per discriminare tra la benignità o malignità della neoplasia vengono distinti dei *cut-off* diversi a seconda della sede e viene introdotta una terza entità, il tumore muscolare liscio a potenziale maligno incerto (Bell et al., 1994; Dall'Asta et al., 2014; Goldblum et al., 2014f; Oliva et al., 2014). Esaminando la casistica con i criteri di medicina veterinaria sono stati diagnosticati un totale di 22 leiomiomi e di 83 leiomiosarcomi. Utilizzando i criteri di medicina umana invece sono state riclassificati 31 leiomiosarcomi di cui come leiomiomi in 20 casi e come neoplasie a potenziale maligno incerto in 11 casi. Di questi 26 casi erano in cani femmine ed originari a livello dell'apparato genitale. Le cause di più frequente riclassificazione sono state una tolleranza più alta verso l'indice mitotico, non più superiore ad 1, come nei *cut-off* di veterinaria, ma inferiore alle 10 mitosi in un totale di 10 campi a forte ingrandimento. Un'altra causa di frequente riclassificazione è stata la differenziazione del tipo di necrosi. Infatti, in medicina umana è specificato che la necrosi tumorale deve essere distinta dalla necrosi ischemica, causata dalle grandi dimensioni che può raggiungere la massa, che si ripercuotono su un'ischemia nelle porzioni centrali. A supporto di questa ipotesi si nota che in questo studio la maggior parte delle neoplasie a carico dell'apparato genitale di dimensioni \geq a 10 cm esaminate con i criteri di veterinaria e classificate come leiomiosarcomi sono state poi riclassificate in tre casi su cinque come leiomiomi e nei restanti due casi come neoplasie a potenziale maligno incerto proprio a causa del tipo di necrosi. Questi criteri sembrano inoltre riflettere il comportamento meno aggressivo delle neoplasie della muscolatura liscia genitale.

Per quanto riguarda l'indice di proliferazione le neoplasie diagnosticate con i criteri di medicina veterinaria avevano per i leiomiomi una mediana di 1,1 e per i leiomiosarcomi una mediana di 3,6. Con i criteri di medicina umana la differenza fra le due categorie aumenta,

passando da una mediana di 1,5 per i leiomiomi ad una mediana di 5 per i leiomiosarcomi (grafico 10). Questi dati sembrano avvalorare l'ipotesi che le diagnosi effettuate tramite i criteri di medicina umana siano più indicative dell'andamento più aggressivo dei leiomiosarcomi, che si riflettono in un indice di proliferazione più elevato.

I dati dei *follow-up* ottenuti sono scarsi. Su 105 casi esaminati solo 25 veterinari hanno dato un *feedback*. Dei 25 casi esaminati di 5 non erano disponibili informazioni sul decorso della malattia né sullo stato di salute dell'animale alla data attuale. Due soggetti hanno riportato invece metastasi epatiche. In entrambi i casi si trattava di casi diagnosticati come leiomiosarcomi uno a carico dell'intestino e l'altro a carico dei tessuti molli nella zona perineale. Questo dato concorda con quelli presenti in letteratura che riportano un tasso metastatico variabile e metastasi a fegato, milza e linfonodi tributari (Kapatkin et al., 1992; Swann and Holt, 2002; Cohen et al., 2003). I dati sui *follow-up* ottenuti sono comunque frammentari, per avere una consistenza su queste informazioni e riuscire a correlare le diagnosi effettuate con il comportamento e l'aggressività delle neoplasie sarebbe opportuno uno studio prospettico.

Conclusioni

Esaminando la casistica con i criteri di veterinaria e medicina umana numerosi casi sono stati riclassificati da leiomiosarcomi a leiomiomi basandosi su una maggior tolleranza verso l'indice mitotico per le neoplasie a sede genitale e differenziando il tipo di necrosi. È stata inoltre introdotta la categoria di UMP nei casi con caratteristiche intermedie. Queste riclassificazioni sembrano seguire in maniera più fedele il comportamento meno aggressivo delle neoplasie della muscolatura liscia genitale. Per validare questa ipotesi sarebbe ideale confermare i criteri impiegati su casistiche più ampie con dati di *follow-up* a lungo termine.

Pubblicazioni e comunicazioni congressuali inerenti

Poster a congressi internazionali:

- Characterization of canine smooth muscle tumour: pilot study on 68 cases; G. Avallone, V. Pellegrino, C. Benazzi, P. Valenti and G. Sarli, Annual meeting ESVP,ECVP, 7/10 settembre 2016, Bologna.
- Human diagnostic criteria of malignancy better reflect the biological behavior in a series of 105 canine smooth muscle tumors. G. Avallone, V. Pellegrino, M. Tecilla, L. Muscatello, P. Roccabianca e G. Sarli, ESVP/ECVP meeting, September 5th-8th 2018 Cluj-Napoca, Romania.

Studio 5: Neoplasie muscolari lisce dei tessuti molli

Obiettivo dello studio

Gli studi relativi ai tumori muscolari lisci dei tessuti molli del cane sono scarsi e relativi principalmente alle forme cutanee e sottocutanee (Liu and Mikaelian, 2003) . Dati più accurati sono presenti invece in letteratura umana, dove i criteri di malignità sono meglio definiti e variano anche in funzione dell'espressione dei recettori degli estrogeni e/o del progesterone. L'espressione di questi recettori sembra essere correlata ad un comportamento biologico meno aggressivo delle neoplasie. Lo scopo dello studio è stato di definire con maggior dettaglio le caratteristiche clinico-patologiche dei tumori muscolari lisci dei tessuti molli del cane e di investigare la loro eventuale espressione di recettori ormonali.

Materiali e metodi

➤ **Selezione della casistica**

Dal precedente studio retrospettivo sui tumori muscolari lisci del cane sono stati selezionati i casi di neoplasie muscolari lisce a carico dei tessuti molli.

➤ **Valutazione istologica**

Per ogni caso sono state allestite nuove sezioni colorate con ematossilina ed eosina e sono stati valutati i seguenti parametri:

- Pattern istologico
- Conta mitotica
- Presenza di necrosi
- Grado istologico (per i leiomioidi)

➤ **Immunoistochimica per i recettori ormonali**

Per ogni caso sono state tagliate al microtomo sezioni seriali di 3 micrometri di spessore, sottoposte a sparaffinatura e reidratate tramite passaggi seriali in alcool a concentrazioni decrescenti secondo protocolli standard. L'inibizione della perossidasi endogena è stata eseguita tramite immersione in H₂O₂ al 3% in metanolo per 30 minuti sotto cappa aspirata. Le sezioni sono poi state immerse in tampone citrato a pH 6,0 e sottoposte a 2 cicli di

microonde a 750 W di 5 minuti ciascuno in microonde per lo smascheramento antigenico per ER (ByoSystems) ed 1 ciclo di microonde a 750W per PR (Calbiochem) e lasciati poi raffreddare a temperatura ambiente per 20 minuti. L'origine, la diluizione ed il tipo di anticorpo sono riportati in tabella:

Antigene	Anticorpo	Tipo; Specie di origine	Diluizione	Casa produttrice
ER	RP141	Policlonale; coniglio	1:200	ByoSystems
PR	PR4-12	Monoclonale; topo	1:50	Calbiochem

Tabella 10: Lista del pannello anticorpale utilizzato per le neoplasie muscolari lisce dei tessuti molli del cane con origine tipo, diluizione e casa produttrice degli anticorpi.

La reazione è stata poi amplificata con il metodo avidina-biotina (ABC kit elite; Vector, Burlingame, CA) ed è stato utilizzato come cromogeno il 3,30-diaminobenzidine allo 0.04% per 4 minuti. Le sezioni sono state controcolorate con l'ematosilina di Mayer, lavate in acqua corrente, disidratate con passaggi in una serie di alcool a concentrazioni crescenti e coperte con vetrino coprioggetto. Come controlli positivi sono stati utilizzati per ER e PR sezioni di utero di cane. I controlli negativi sono stati ottenuti mediante l'omissione dell'anticorpo primario sulle sezioni seriali dei campioni utilizzati come controlli positivi. L'espressione di ER e PR è stata valuta in maniera semiquantitativa sulla sezione intera ad un ingrandimento intermedio (20x) stimando la percentuale di cellule neoplastiche positive ai diversi anticorpi. La variazione dell'intensità e la reattività dello stroma sono state osservate ma non incluse nel sistema di valutazione finale perché giudicate inattendibili a causa della natura retrospettiva dello studio e dei tempi variabili di fissazione e conservazione in archivio dei tessuti esaminati.

Risultati

Sono stati raccolti 21 tumori muscolari lisci a carico dei tessuti molli in altrettanti cani. Undici cani erano femmine, di cui 4 sterilizzate, e 10 maschi, di cui uno castrato.

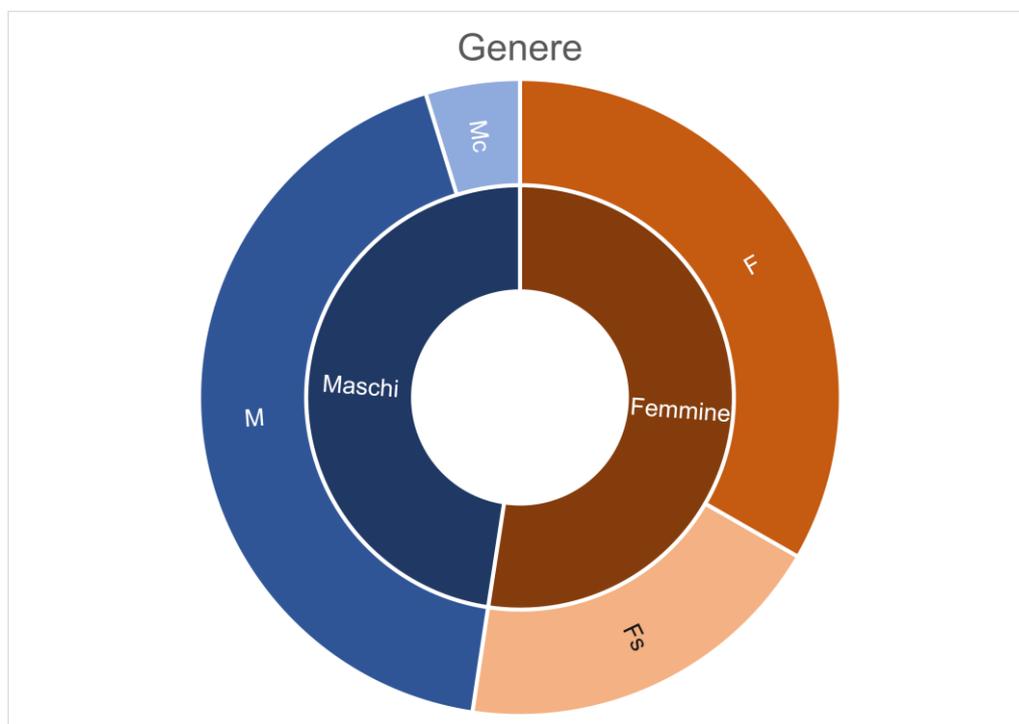


Grafico 11: Sesso degli animali affetti da neoplasie muscolari lisce dei tessuti molli. Il 76,2 % degli animali affetti sono maschi o femmine interi.

Dieci casi erano sottocutanei, 5 a carico degli arti, 3 perineali e 2 perianali, 5 pelvici, 5 retroperitoneali ed uno intraddominale. Sono stati diagnosticati 19 leiomiiosarcomi e 2 leiomiomi utilizzando i criteri descritti in medicina veterinaria e 18 leiomiiosarcomi e 3 leiomiomi utilizzando i criteri di medicina umana. Un caso è stato riclassificato da leiomiiosarcoma a leiomioma poiché la diagnosi di malignità era basata sulla presenza di necrosi che era però di tipo ischemico (vedi sezione precedente). Undici leiomiiosarcomi erano di grado 1, 4 di grado 2 e 3 di grado 3. Il caso riclassificato era stato diagnosticato in prima istanza come leiomiiosarcoma di grado 1. In tutti i casi esaminati il pattern istologico principale era la presenza di fasci intersecanti. Ad essi si associavano caratteristiche istologiche meno frequenti tra cui:

- Pattern trabecolare (2 casi)
- Pattern mixoide (1 caso)
- Palizzate nucleari (2 casi) (fig. 25)

- Presenza di cellule neoplastiche multinucleate (2 casi) (fig. 26)
- Presenza di aree ialinizzate (1 caso) (fig. 27)

Il recettore per il progesterone era espresso in due neoplasie (fig. 28), insorte in due femmine intere, di cui la prima era un leiomioma retroperitoneale e la seconda un leiomiosarcoma perineale in co-espressione con il recettore per gli estrogeni.

I recettori per gli estrogeni erano espressi in un totale di 6 neoplasie (fig. 29), tutte insorte in soggetti interi, di cui 3 maschi e 3 femmine. Di questi, 4 neoplasie erano localizzate a livello perineale, 1 retroperitoneale, e 1 intrapelvica. I risultati sono riassunti nella tabella sottostante:

	ER Positivi	PR Positivi
Perineo	1	1
Cavità pelvica	1	0
Retroperitoneale	4	1

Tabella 11: Risultati dell'immunoistochimica per recettori degli estrogeni (ER) e del progesterone nelle neoplasie muscolari lisce dei tessuti molli del cane, in relazione alla sede di insorgenza.

Discussione

L'espressione dei recettori degli estrogeni e del progesterone in medicina umana sembra essere correlata ad un comportamento biologico meno aggressivo delle neoplasie. Infatti, per le neoplasie che esprimono questi recettori, si applicano gli stessi criteri applicati ai tumori muscolari lisci dell'apparato genitale femminile, con una maggior tolleranza dell'attività proliferativa (Goldblum et al., 2014f). Dai risultati ottenuti è evidente che le neoplasie che esprimono i recettori ormonali siano localizzate prevalentemente a carico delle zone perineali, pelviche e retroperitoneali. Questo dato potrebbe supportare la teoria che esista un sottogruppo di neoplasie muscolari lisce dei tessuti molli che potrebbero originare da muscolatura ormono-sensibile, presente in quei distretti anatomici (Paal and Miettinen, 2001). Uno studio su 56 casi di leiomiomi e leiomiosarcomi retroperitoneali evidenzia come nella maggior parte delle neoplasie benigne esprimessero i recettori degli estrogeni e/o del progesterone, mentre i leiomiosarcomi erano sempre negativi a entrambi

i recettori. Altri autori asseriscono che l'80% dei leiomiomi ed il 70% dei leiomiosarcomi genitali esprimono i recettori per gli estrogeni, mentre solo raramente è riportata la positività dei leiomiosarcomi retroperitoneali (Rao et al., 1999).

In veterinaria le ricerche in merito sono ancora scarse, tuttavia alcuni studi affermano che i cani con leiomiomi uterini erano esclusivamente femmine intere, e che la percentuale di recidiva era di un 15% solo nelle femmine che non erano state sterilizzate al tempo della chirurgia (Thacher and Bradley, 1983). Un altro studio afferma che non è stato riscontrato nessun leiomioma in cagne sterilizzate prima dei due anni di vita (Brodey and Roszel, 1967). Questi riscontri supportano che i leiomiomi possano essere ormono-sensibili. Inoltre, l'espressione dei recettori ormonali è stata dimostrata sia nell'apparato genitale della donna che della cagna nei tumori muscolari lisci, riportando l'espressione dei recettori degli estrogeni e del progesterone. Il 50% dei leiomiomi esaminati era positiva ai recettori degli estrogeni e oltre l'82% era positiva a quelli del progesterone (Millán et al., 2007). Il riscontro di un gruppo di neoplasie muscolari lisce a carico dei tessuti molli che esprime questi recettori può quindi rappresentare un sottogruppo di neoplasie muscolari lisce dei tessuti molli che siano anch'esse ormono-sensibili e per le quali potrebbe essere necessario applicare specifici criteri diagnostici. Questo potrebbe avere inoltre un importante impatto terapeutico. Ulteriori studi sono necessari ai fini di provare questa teoria.

Conclusione

Nei STM a carico dei tessuti molli sono state esaminate le caratteristiche clinico-patologiche e l'espressione dei recettori ormonali: un sottogruppo di queste neoplasie è risultato positivo ai recettori ormonali a sede perineale, pelvica e retroperitoneali. Questo risultato suggerisce l'esistenza di ST-SMT canini che possono insorgere da leiomiociti sensibili alle variazioni ormonali in queste regioni anatomiche, come accade nell'uomo, il che potrebbe avere ripercussioni sul comportamento biologico e su eventuali trattamenti terapeutici.

Pubblicazioni e comunicazioni congressuali inerenti

Poster a congressi internazionali:

- Canine smooth muscle tumors of soft tissue: a case series of 23 cases, G. Avallone, V. Pellegrino, P. Roccabianca, M. Tecilla, C. Benazzi, G. Sarli, ESVP/ECVP meeting, 30th August – 2nd September 2017-Lyon, France.

Documentazione fotografica neoplasie muscolari lisce

Studio 3: Validazione della tecnica dei *Tissue Micro Array* per la distinzione tra neoplasie muscolari lisce e GIST.

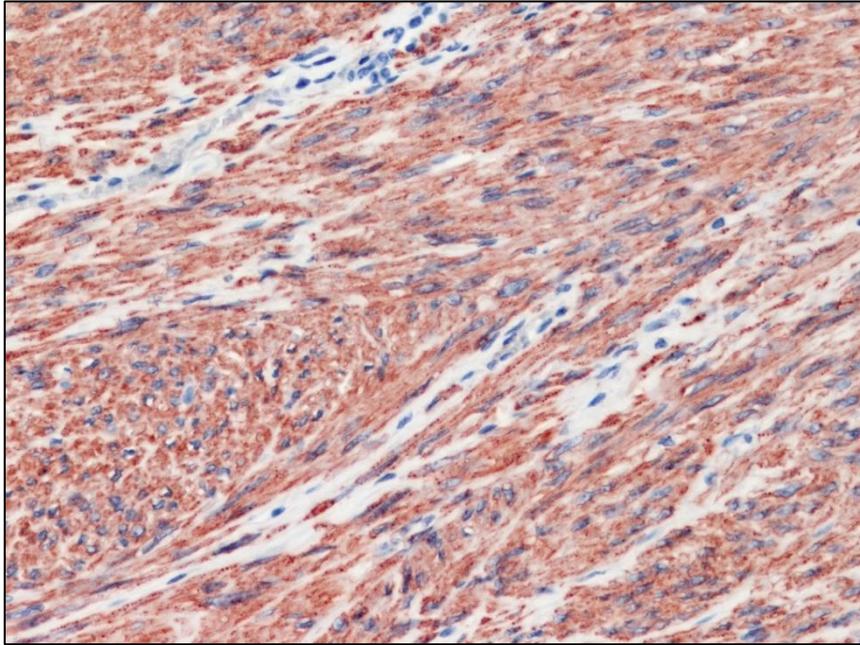


Figura 19: cane: leiomiosarcoma: espressione citoplasmatica di α -sma. Colorazione immunohistochimica per α -sma, cromogeno AEC, controcolorazione con ematossilina.

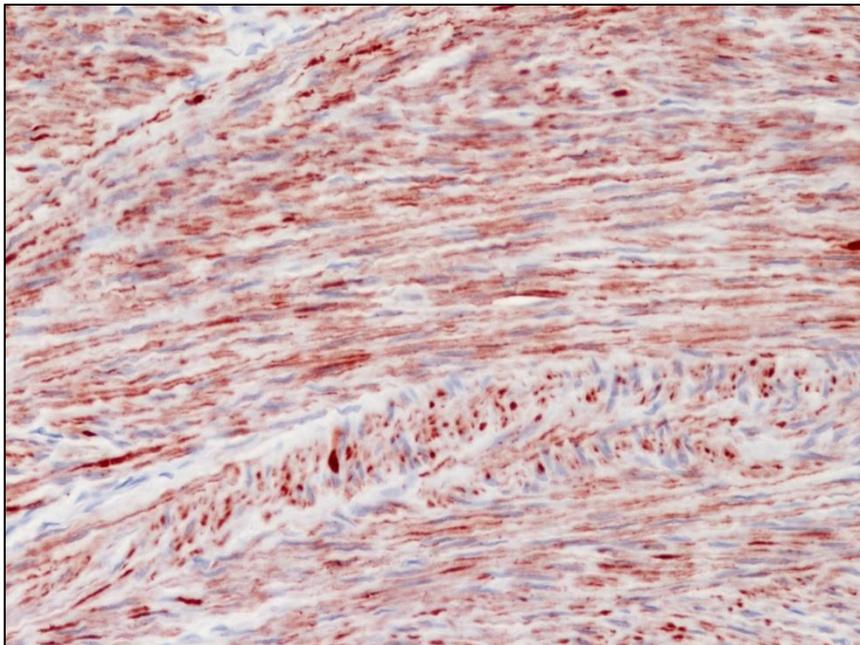


Figura 20: cane: leiomiosarcoma. Espressione citoplasmatica della desmina. Colorazione immunohistochimica per desmina, cromogeno AEC, controcolorazione con ematossilina.

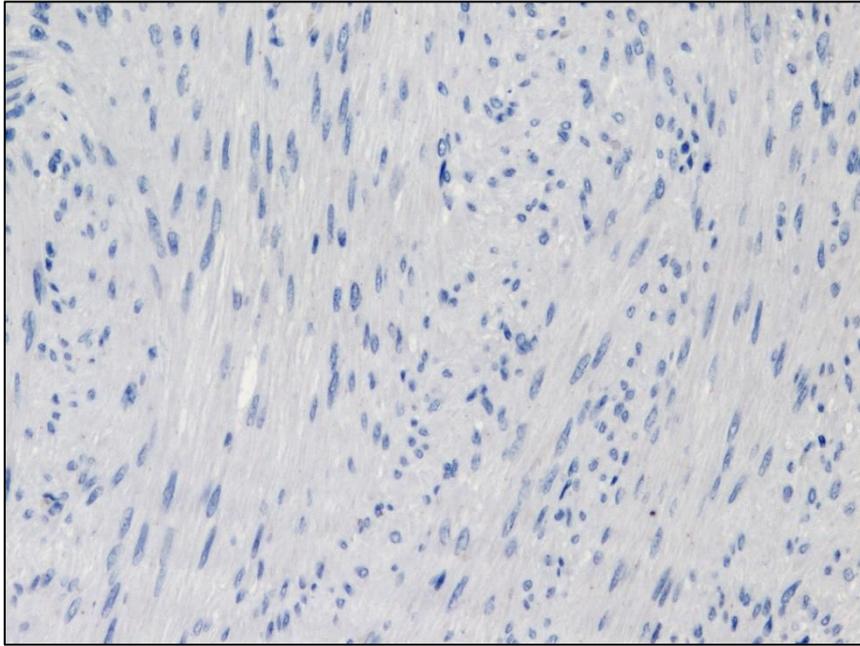


Figura 21: cane: leiomiosarcoma. Nessuna espressione di c-kit. Colorazione immunohistochimica per c-kit, cromogeno AEC, controcolorazione con ematossilina.

Studio 4: Neoplasie muscolari lisce del cane: la sottile linea tra benigno e maligno

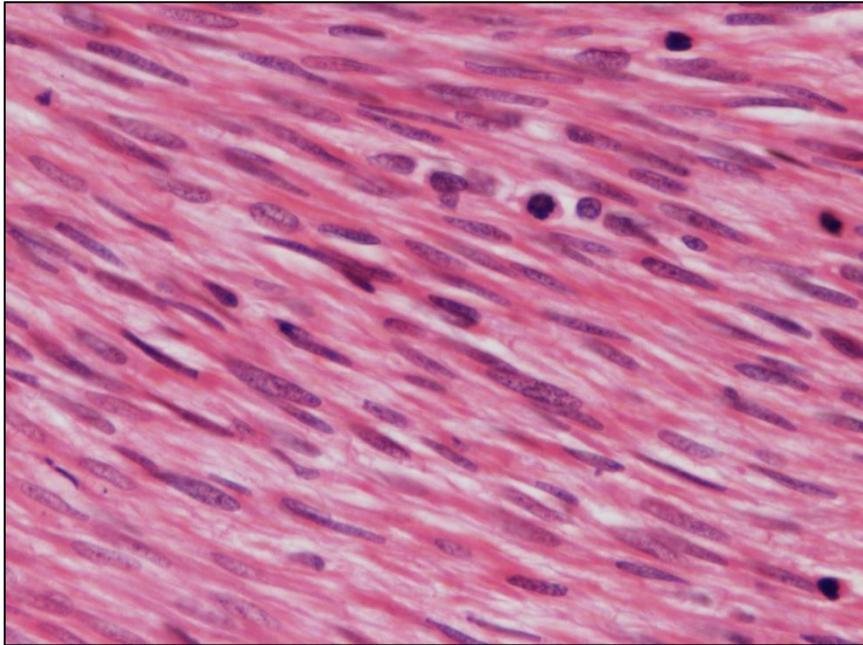


Figura 22: cane, leiomiosarcoma. Presenza di numerose mitosi. Ematossilina-eosina.

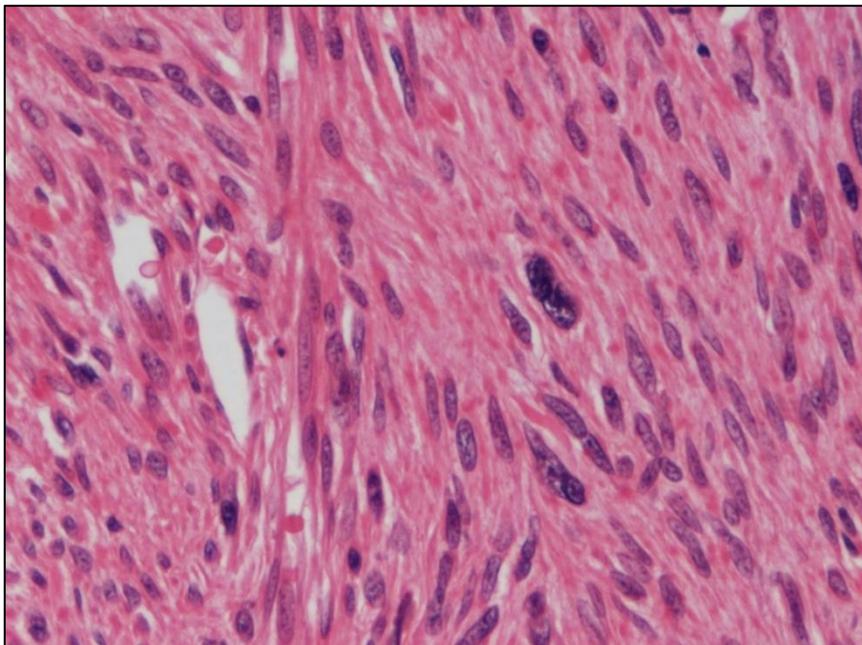


Figura 23: cane, leiomiosarcoma: neoplasia densamente cellulare, composta da fasci intrecciati di cellule fusate in scarsa matrice collagene e moderate atipie cellulari. Ematossilina-eosina.

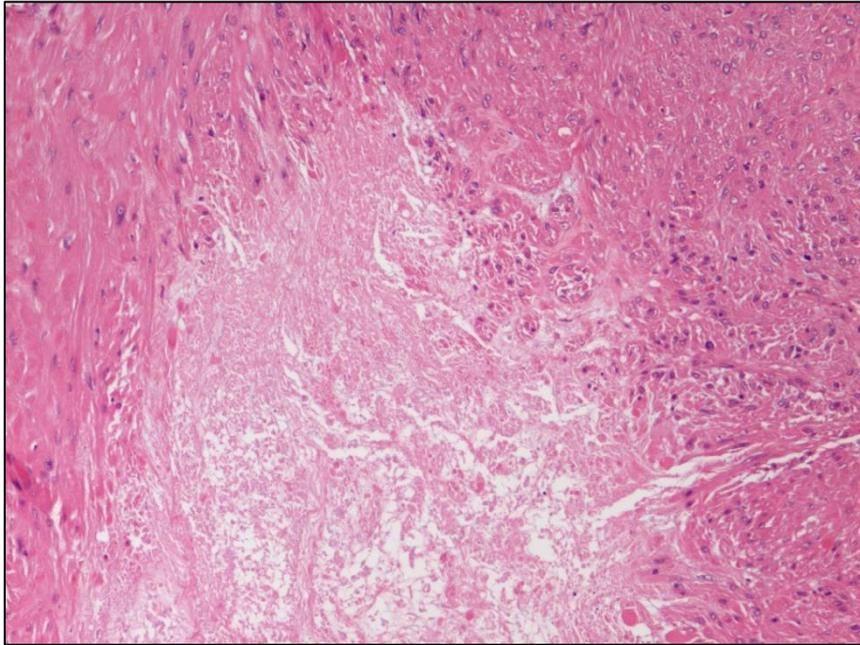


Figura 24: cane, leiomiosarcoma. Presenza di necrosi tumorale all'interno della neoplasia. Ematossilina-eosina.

Studio 5: Neoplasie muscolari lisce dei tessuti molli

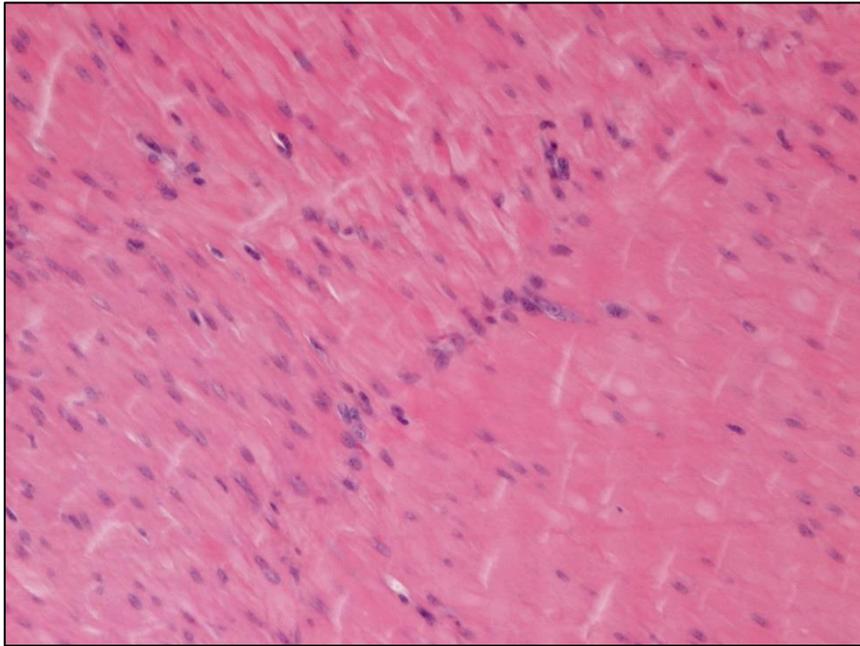


Figura 25: cane, leiomiosarcoma dei tessuti molli. Caso con nuclei disposti a palizzata. Ematossilina-eosina.

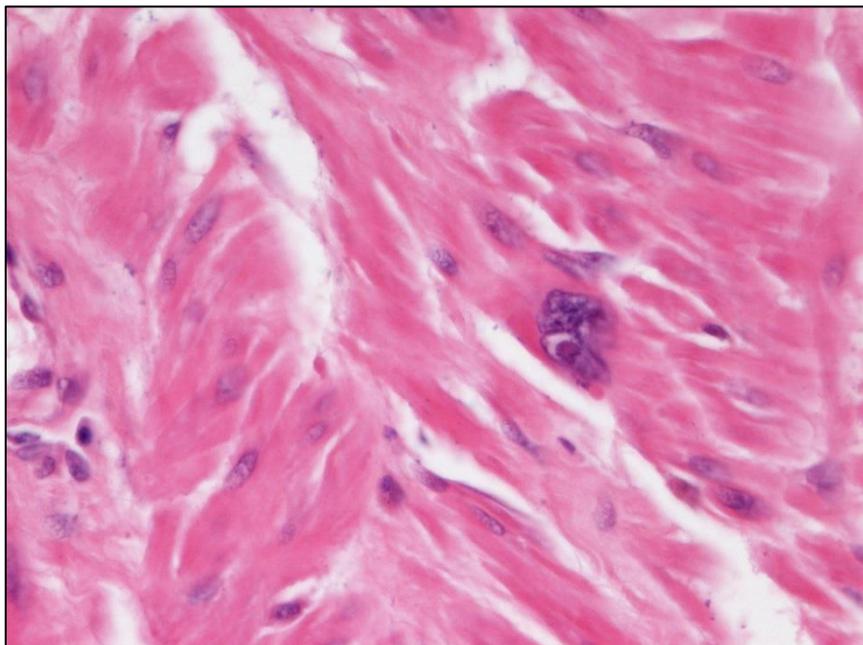


Figura 26: cane, leiomiosarcoma dei tessuti molli. Presenza di cellule neoplastiche multinucleate. Ematossilina-eosina.

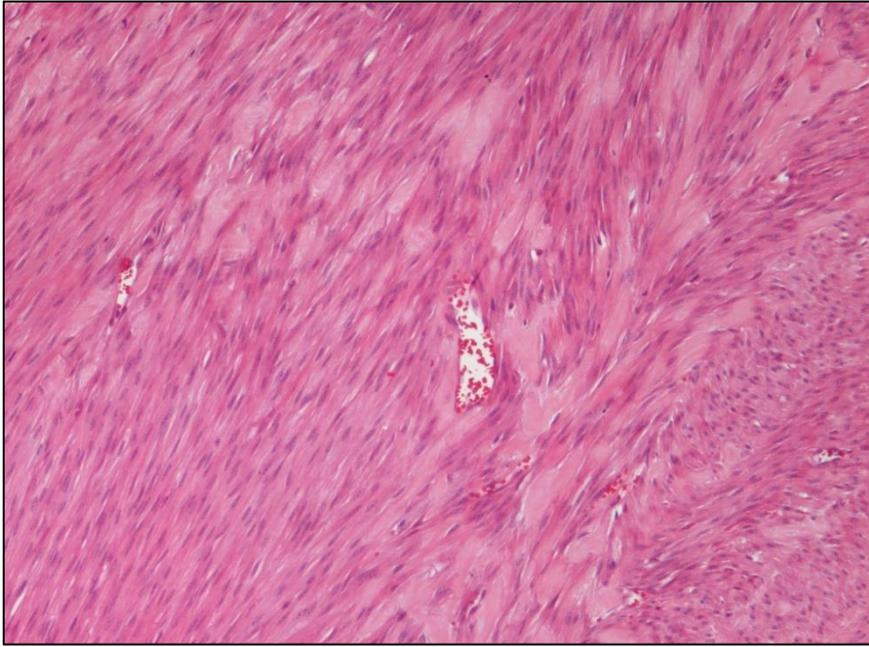


Figura 28: cane, leiomiosarcoma dei tessuti molli: multifocali aree di collagene ialinizzato. Ematossilina-eosina.

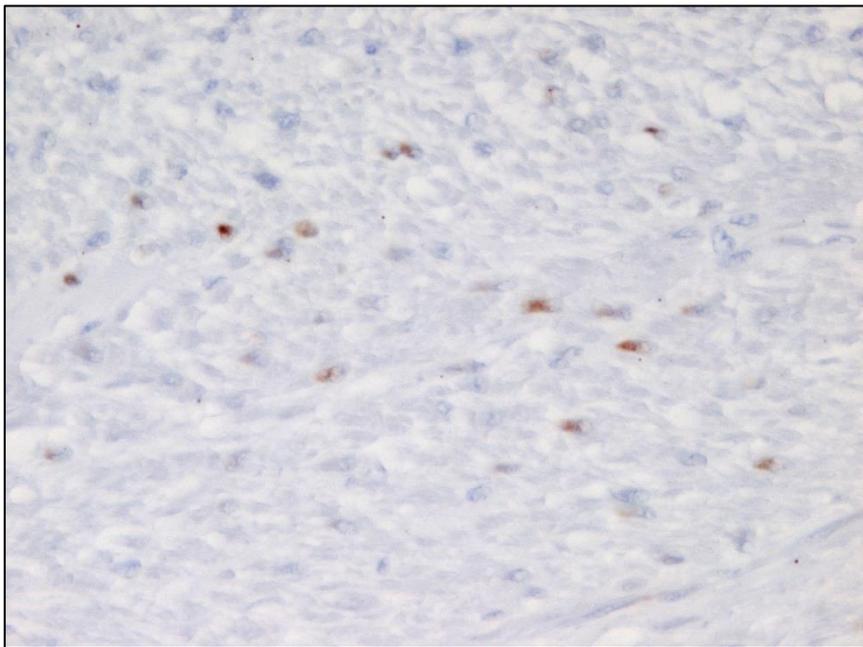


Figura 27: cane: leiomiosarcoma. Espressione nucleare del progesterone. Colorazione immunohistochimica per PR, cromogeno AEC, controcolorazione con ematossilina.

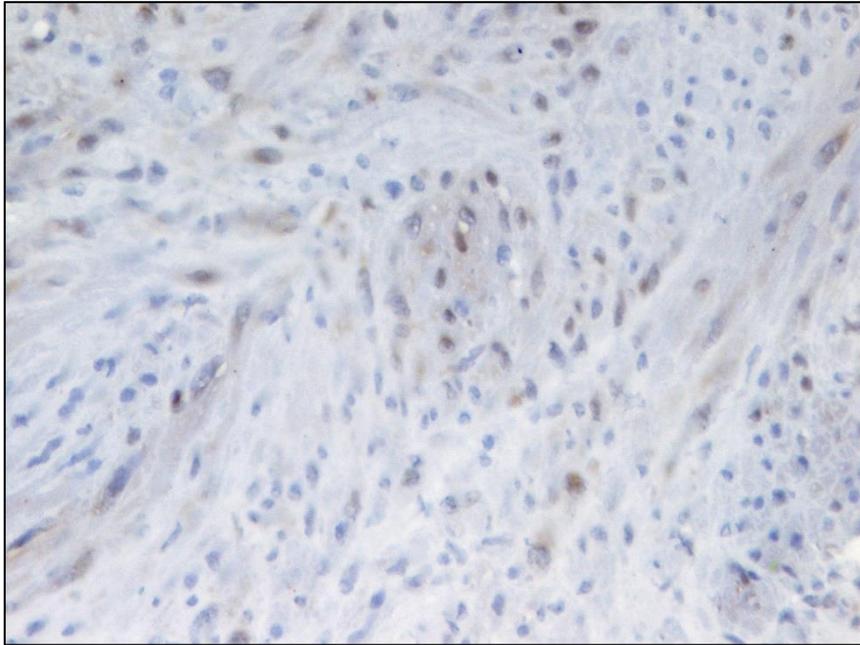


Figura 29: cane: leiomiosarcoma. Espressione nucleare dell'estrogeno. Colorazione immunohistochimica per ER, cromogeno AEC, controcolorazione con ematossilina.

Bibliografia

- Alam, N.A., Olpin, S., Leigh, I.M., 2005. Fumarate hydratase mutations and predisposition to cutaneous leiomyomas, uterine leiomyomas and renal cancer. *Br. J. Dermatol.* 153, 11–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06678.x>
- Albers, G.W., Theilen, G.H., 1985. Calcium chloride for treatment of subcutaneous lipomas in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186, 492–494.
- Al-Talib, A., Al-Farsi, A.R., Stanimir, G., 2009. Leiomyomatosis Peritonealis Disseminata with Features of Carcinomatosis on Laparoscopy. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 9, 315–318.
- Alvegård, T.A., Sigurdsson, H., Mouridsen, H., Solheim, O., Unsgaard, B., Ringborg, U., Dahl, O., Nordentoft, A.M., Blomqvist, C., Rydholm, A., 1989. Adjuvant chemotherapy with doxorubicin in high-grade soft tissue sarcoma: a randomized trial of the Scandinavian Sarcoma Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 7, 1504–1513. <https://doi.org/10.1200/JCO.1989.7.10.1504>
- Antonescu, C., Ladanyi, M., 2013. Myxoid liposarcoma in Adipocytic tumours, in: Fletcher, D.M.C., Organizzazione mondiale della sanità, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Eds.), *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 39–41.
- Aricò, A., Guadagnin, E., Ferrareso, S., Gelain, M.E., Iussich, S., Rütgen, B.C., Mazzariol, S., Marconato, L., Aresu, L., 2014. Platelet-derived growth factors and receptors in Canine Lymphoma. *J. Comp. Pathol.* 151, 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.07.001>
- Asa, S.A., Murai, A., Murakami, M., Hoshino, Y., Mori, T., Maruo, K., Khater, A., El-Sawak, A., el-Aziz, E.A., Yanai, T., Sakai, H., 2012. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in spontaneous canine hemangiosarcoma and cutaneous hemangioma. *Histol. Histopathol.* 27, 601–607. <https://doi.org/10.14670/HH-27.601>
- Avallone, G., Helmbold, P., Caniatti, M., Stefanello, D., Nayak, R.C., Roccabianca, P., 2007. The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization. *Vet. Pathol.* 44, 607–620. <https://doi.org/10.1354/vp.44-5-607>
- Avallone, G., Roccabianca, P., Crippa, L., Lepri, E., Brunetti, B., Bernardini, C., Forni, M., Olandese, A., Sarli, G., 2016. Histological Classification and Immunohistochemical Evaluation of MDM2 and CDK4 Expression in Canine Liposarcoma. *Vet. Pathol.* 53, 773–780. <https://doi.org/10.1177/0300985815626573>
- Avallone, G., Stefanello, D., Boracchi, P., Ferrari, R., Gelain, M.E., Turin, L., Tresoldi, E., Roccabianca, P., 2015. Growth Factors and COX2 Expression in Canine Perivascular Wall Tumors. *Vet. Pathol.* 52, 1034–1040. <https://doi.org/10.1177/0300985815575050>
- Bacci, B., Vignoli, M., Rossi, F., Gallorini, F., Terragni, R., Laddaga, E.L., Sarli, G., 2010. Primary prostatic leiomyosarcoma with pulmonary metastases in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 46, 103–106. <https://doi.org/10.5326/0460103>
- Baez, J.L., Hendrick, M.J., Shofer, F.S., Goldkamp, C., Sorenmo, K.U., 2004. Liposarcomas in dogs: 56 cases (1989-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224, 887–891.
- Bansal, D., Varghese, J., Babu, M., Mehta, N., Rathore, R.S., Mehta, S., Pillai, B.S., Sam, M.P., Moorthy, K., 2016. Leiomyosarcoma Presenting as a Scrotal Mass. *Urol. Case Rep.* 7, 42–44. <https://doi.org/10.1016/j.eucr.2016.04.009>

- Barlogie, B., Desikan, R., Eddlemon, P., Spencer, T., Zeldis, J., Munshi, N., Badros, A., Zangari, M., Anaissie, E., Epstein, J., Shaughnessy, J., Ayers, D., Spoon, D., Tricot, G., 2001. Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent thalidomide: identification of prognostic factors in a phase 2 study of 169 patients. *Blood* 98, 492–494.
- Barnes, M., Duray, P., DeLuca, A., Anderson, W., Sindelar, W., Kinsella, T., 1990. Tumor induction following intraoperative radiotherapy: late results of the National Cancer Institute canine trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19, 651–660.
- Bell, S.W., Kempson, R.L., Hendrickson, M.R., 1994. Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 18, 535–558.
- Bellah, J.R., Ginn, P.E., 1996. Gastric leiomyosarcoma associated with hypoglycemia in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 32, 283–286. <https://doi.org/10.5326/15473317-32-4-283>
- Beltran, M.A., Cruces, K.S., 2007. Primary tumors of jejunum and ileum as a cause of intestinal obstruction: A case control study. *Int. J. Surg.* 5, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijso.2006.05.006>
- Berretta, R., Rolla, M., Merisio, C., Giordano, G., Nardelli, G.B., 2008. Uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential: a three-case report. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* 18, 1121–1126. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.01125.x>
- Berzon, J.L., 1979. Primary leiomyosarcoma of the ureter in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 374–376.
- Bettini, G., Morini, M., Marcato, P.S., 2003. Gastrointestinal spindle cell tumours of the dog: histological and immunohistochemical study. *J. Comp. Pathol.* 129, 283–293.
- Billings, S.D., Folpe, A.L., 2007. Diagnostically challenging spindle cell lipomas: a report of 34 “low-fat” and “fat-free” variants. *Am. J. Dermatopathol.* 29, 437–442. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31813735df>
- Billings, S.D., Folpe, A.L., Weiss, S.W., 2001. Do leiomyomas of deep soft tissue exist? An analysis of highly differentiated smooth muscle tumors of deep soft tissue supporting two distinct subtypes. *Am. J. Surg. Pathol.* 25, 1134–1142.
- Binh, M.B.N., Sastre-Garau, X., Guillou, L., Pinieux, G. de, Terrier, P., Lagacé, R., Aurias, A., Hostein, I., Coindre, J.M., 2005. MDM2 and CDK4 Immunostainings Are Useful Adjuncts in Diagnosing Well-Differentiated and Dedifferentiated Liposarcoma Subtypes: A Comparative Analysis of 559 Soft Tissue Neoplasms With Genetic Data. *Am. J. Surg. Pathol.* 29, 1340. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000170343.09562.39>
- Black, A.P., Liu, S., Randolph, J.F., 1981. Primary tracheal leiomyoma in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179, 905–907.
- Blackwood, L., Sullivan, M., Thompson, H., 1992. Urethral leiomyoma causing post renal failure in a bitch. *Vet. Rec.* 131, 416–417.
- Boerkamp, K.M., Hellmén, E., Willén, H., Grinwis, G.C.M., Teske, E., Rutteman, G.R., 2016. Unclassified sarcomas: a study to improve classification in a cohort of Golden Retriever dogs. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 28, 623–631. <https://doi.org/10.1177/1040638716660130>
- Böttcher, P., Klüter, S., Krastel, D., Grevel, V., 2007. Liposuction--removal of giant lipomas for weight loss in a dog with severe hip osteoarthritis. *J. Small Anim. Pract.* 48, 46–48. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2006.00287.x>

- Bramwell, V., Rouesse, J., Steward, W., Santoro, A., Schraffordt-Koops, H., Buesa, J., Ruka, W., Priario, J., Wagener, T., Burgers, M., 1994. Adjuvant CYVADIC chemotherapy for adult soft tissue sarcoma--reduced local recurrence but no improvement in survival: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 12, 1137–1149. <https://doi.org/10.1200/JCO.1994.12.6.1137>
- Brattström, D., Bergqvist, M., Larsson, A., Holmertz, J., Hesselius, P., Rosenberg, L., Brodin, O., Wagenius, G., 1998. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera from non-small cell lung cancer patients. *Anticancer Res.* 18, 1123–1127.
- Brodey, R.S., Roszel, J.F., 1967. Neoplasms of the canine uterus, vagina, and vulva: a clinicopathologic survey of 90 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 151, 1294–1307.
- Brown, F.M., Fletcher, C.D., 2000. Problems in grading soft tissue sarcomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 114 Suppl, S82-89.
- Bryan, R.D., Frame, R.W., Kier, A.B., 1981. Tracheal leiomyoma in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178, 1069–1070.
- Buishand, F.O., Visser, J., Kik, M., Gröne, A., Keesler, R.I., Briaire-de Bruijn, I.H., Kirpensteijn, J., 2014. Evaluation of prognostic indicators using validated canine insulinoma tissue microarrays. *Vet. J.* 201, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.004>
- Canter, R.J., Beal, S., Borys, D., Martinez, S.R., Bold, R.J., Robbins, A.S., 2010. Interaction of histologic subtype and histologic grade in predicting survival for soft-tissue sarcomas. *J. Am. Coll. Surg.* 210, 191-198.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2009.10.007>
- Carpenter, J.L., Hamilton, T.A., 1995. Angioleiomyoma of the nasopharynx in a dog. *Vet. Pathol.* 32, 721–723. <https://doi.org/10.1177/030098589503200617>
- Casali, P.G., Abecassis, N., Bauer, S., Biagini, R., Bielack, S., Bonvalot, S., Boukovinas, I., Bovee, J.V.M.G., Brodowicz, T., Broto, J.M., Buonadonna, A., De Álava, E., Dei Tos, A.P., Del Muro, X.G., Dileo, P., Eriksson, M., Fedenko, A., Ferraresi, V., Ferrari, A., Ferrari, S., Frezza, A.M., Gasperoni, S., Gelderblom, H., Gil, T., Grignani, G., Gronchi, A., Haas, R.L., Hannu, A., Hassan, B., Hohenberger, P., Issels, R., Joensuu, H., Jones, R.L., Judson, I., Jutte, P., Kaal, S., Kasper, B., Kopeckova, K., Krákorová, D.A., Le Cesne, A., Lugowska, I., Merimsky, O., Montemurro, M., Pantaleo, M.A., Piana, R., Picci, P., Piperno-Neumann, S., Pousa, A.L., Reichardt, P., Robinson, M.H., Rutkowski, P., Safwat, A.A., Schöffski, P., Sleijfer, S., Stacchiotti, S., Sundby Hall, K., Unk, M., Van Coevorden, F., Van der Graaf, W., Whelan, J., Wardelmann, E., Zaikova, O., Blay, J.Y., ESMO Guidelines Committee and EURACAN, 2018. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann. Oncol.* 29, iv51–iv67. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy096>
- Chang, H.R., Hajdu, S.I., Collin, C., Brennan, M.F., 1989. The prognostic value of histologic subtypes in primary extremity liposarcoma. *Cancer* 64, 1514–1520.
- Chao, C., Al-Saleem, T., Brooks, J.J., Rogatko, A., Kraybill, W.G., Eisenberg, B., 2001. Vascular endothelial growth factor and soft tissue sarcomas: tumor expression correlates with grade. *Ann. Surg. Oncol.* 8, 260–267.
- Charifa, A., Badri, T., 2018. Lipomas, Pathology, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Chase, D., Bray, J., Ide, A., Polton, G., 2009. Outcome following removal of canine spindle cell tumours in first opinion practice: 104 cases. *J. Small Anim. Pract.* 50, 568–574. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2009.00809.x>

- Chen, S., Dai, X., Gao, Y., Shen, F., Ding, J., Chen, Q., 2017. The positivity of estrogen receptor and progesterone receptor may not be associated with metastasis and recurrence in epithelial ovarian cancer. *Sci. Rep.* 7, 16922. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17265-6>
- Christenson, L.J., Smith, K., Arpey, C.J., 2000. Treatment of multiple cutaneous leiomyomas with CO2 laser ablation. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg.* 26, 319–322.
- Chu, M.C., Mor, G., Lim, C., Zheng, W., Parkash, V., Schwartz, P.E., 2003. Low-grade endometrial stromal sarcoma: hormonal aspects. *Gynecol. Oncol.* 90, 170–176.
- Cohen, M., Post, G.S., Wright, J.C., 2003. Gastrointestinal leiomyosarcoma in 14 dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 107–110.
- Coindre, J., 2013. Grading and staging of sarcomas in Tumours of soft tissue: Introduction, in: Fletcher, D.M.C., Organizzazione mondiale della sanità, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Eds.), *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 17–18.
- Coindre, J., Pedetoutour, F., 2013. Pleomorphic liposarcoma in Adipocytic tumours, in: Fletcher, D.M.C., Organizzazione mondiale della sanità, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Eds.), *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 42–44.
- Coindre, J.M., Trojani, M., Contesso, G., David, M., Rouesse, J., Bui, N.B., Bodaert, A., De Mascarel, I., De Mascarel, A., Goussot, J.F., 1986. Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer* 58, 306–309.
- Cooper, B., Valentine, B.A., 2017. Tumors of Muscle, in: *Tumors in Domestic Animals*. Wiley, Ames, Iowa, pp. 425–466.
- Crago, A.M., Brennan, M.F., 2015. Principles in Management of Soft Tissue Sarcoma. *Adv. Surg.* 49, 107–122. <https://doi.org/10.1016/j.yasu.2015.04.002>
- Culbertson, R., Branam, J.E., Rosenblatt, L.S., 1983. Esophageal/gastric leiomyoma in the laboratory Beagle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183, 1168–1171.
- Dahl, I., Angervall, L., 1974. Cutaneous and subcutaneous leiomyosarcoma. A clinicopathologic study of 47 patients. *Pathol. Eur.* 9, 307–315.
- Dall’Asta, A., Gizzo, S., Musarò, A., Quaranta³, M., Noventa, M., Migliavacca, C., Sozzi, G., Monica, M., Mautone, D., Berretta, R., 2014. Uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP): pathology, follow-up and recurrence. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 8136–8142.
- D’Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E., Folkman, J., 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4082–4085.
- Davidson, B., Kjæreng, M.L., Førstund, M., Danielsen, H.E., Kristensen, G.B., Abeler, V.M., 2016. Progesterone Receptor Expression Is an Independent Prognosticator in FIGO Stage I Uterine Leiomyosarcoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 145, 449–458. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw030>
- de Queiroz, G.F., Dagli, M.L.Z., Fukumasu, H., Zavala, A.A.Z., Matera, J.M., 2010. Vascular endothelial growth factor expression and microvascular density in soft tissue sarcomas in dogs. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 22, 105–108. <https://doi.org/10.1177/104063871002200121>
- Dei Tos, A., 2000. Liposarcoma: New entities and evolving concepts. *Ann. Diagn. Pathol.* 4, 252–266. <https://doi.org/10.1053/adpa.2000.8133>

- Dei Tos, A., Marino-Enriquez, A., Pedeteur, F., Rossi, S., 2013. Dedifferentiated liposarcoma in Adipocytic tumours, in: Fletcher, D.M.C., Organizzazione mondiale della sanità, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Eds.), WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 37–38.
- Dei Tos, A., Pedeteur, F., 2013. Atypical lipomatous tumour in Adipocytic tumours, in: Fletcher, D.M.C., Organizzazione mondiale della sanità, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Eds.), WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 33–36.
- Demicco, E.G., Wani, K., Fox, P.S., Bassett, R.L., Young, E.D., Lev, D., Aldape, K.D., Lazar, A.J., Wang, W.-L., 2015. Histologic variability in solitary fibrous tumors reflects angiogenic and growth factor signaling pathway alterations. *Hum. Pathol.* 46, 1015–1026. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.03.014>
- Dennis, M.M., McSparran, K.D., Bacon, N.J., Schulman, F.Y., Foster, R.A., Powers, B.E., 2011. Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. *Vet. Pathol.* 48, 73–84. <https://doi.org/10.1177/0300985810388820>
- Dernell, W.S., Withrow, S.J., Kuntz, C.A., Powers, B.E., 1998. Principles of treatment for soft tissue sarcoma. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 13, 59–64. [https://doi.org/10.1016/S1096-2867\(98\)80029-7](https://doi.org/10.1016/S1096-2867(98)80029-7)
- Dettwiler, M., Croci, M., Vaughan, L., Guscetti, F., 2013. Immunohistochemical expression study of proapoptotic BH3-only protein bad in canine nonneoplastic tissues and canine lymphomas. *Vet. Pathol.* 50, 789–796. <https://doi.org/10.1177/0300985813478212>
- Dirix, L.Y., Van Oosterom, A.T., 1999. Soft tissue sarcoma in adults. *Curr. Opin. Oncol.* 11, 285–295.
- Domanski, H.A., 2007. Fine-needle aspiration cytology of soft tissue lesions: diagnostic challenges. *Diagn. Cytopathol.* 35, 768–773. <https://doi.org/10.1002/dc.20765>
- Downes, K.A., Goldblum, J.R., Montgomery, E.A., Fisher, C., 2001. Pleomorphic liposarcoma: a clinicopathologic analysis of 19 cases. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 14, 179–184. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880280>
- Duhig, J.T., Ayer, J.P., 1959. Vascular leiomyoma. A study of sixtyone cases. *Arch. Pathol.* 68, 424–430.
- Dvir, E., Clift, S.J., 2010. Evaluation of selected growth factor expression in canine spirocercosis (*Spirocerca lupi*)-associated non-neoplastic nodules and sarcomas. *Vet. Parasitol.* 174, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.032>
- Ellenson, L., Pirog, E., 2015. The Female Genital Tract, in: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier, Philadelphia, pp. 991–1042.
- Ettinger, S.N., 2003. Principles of treatment for soft-tissue sarcomas in the dog. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 18, 118–122. <https://doi.org/10.1053/svms.2003.36628>
- Ettinger, S.N., Scase, T.J., Oberthaler, K.T., Craft, D.M., McKnight, J.A., Leibman, N.F., Charney, S.C., Bergman, P.J., 2006. Association of argyrophilic nucleolar organizing regions, Ki-67, and proliferating cell nuclear antigen scores with histologic grade and survival in dogs with soft tissue sarcomas: 60 cases (1996–2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 1053–1062. <https://doi.org/10.2460/javma.228.7.1053>
- Evans, H.L., 2007. Atypical lipomatous tumor, its variants, and its combined forms: a study of 61 cases, with a minimum follow-up of 10 years. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 1–14. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213406.95440.7a>

- Fahey, C.E., Milner, R.J., Kow, K., Bacon, N.J., Salute, M.E., 2013. Apoptotic effects of the tyrosine kinase inhibitor, masitinib mesylate, on canine osteosarcoma cells: *Anticancer. Drugs* 24, 519–526. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32836002ba>
- Ferrara, N., 2000. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* 55, 15–35; discussion 35-36.
- Ferrari, A., Sultan, I., Huang, T.T., Galindo, C.R., Shehadeh, A., Meazza, C., Ness, K.K., Casanova, M., Spunt, S.L., 2011. Soft Tissue Sarcoma Across the Age Spectrum: A Population-Based Study from the Surveillance Epidemiology and End Results Database. *Pediatr. Blood Cancer* 57, 943–949. <https://doi.org/10.1002/pbc.23252>
- Fields, J.P., Helwig, E.B., 1981. Leiomyosarcoma of the skin and subcutaneous tissue. *Cancer* 47, 156–169.
- Fletcher, C., Gronchi, A., 2013a. Epidemiology in Tumours of soft tissue: Introduction, in: Fletcher, D.M.C., Organizzazione mondiale della sanità, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Eds.), *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, p. 14.
- Fletcher, C., Gronchi, A., 2013b. Etiology in Tumours of soft tissue: Introduction, in: Fletcher, D.M.C., Organizzazione mondiale della sanità, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Eds.), *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 14–15.
- Fletcher, D.M.C., Organizzazione mondiale della sanità, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Eds.), 2013a. *WHO classification of tumours of soft tissue and bone*, 4. ed. ed. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Fletcher, D.M.C., Organizzazione mondiale della sanità, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Eds.), 2013b. *WHO classification of tumours of soft tissue and bone*, 4. ed. ed. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Fonseca-Alves, C.E., Bento, D.D., Torres-Neto, R., Werner, J., Kitchell, B., Laufer-Amorim, R., 2015. Ki67/KIT double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs. *Res. Vet. Sci.* 102, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.08.007>
- Forrest, L.J., Chun, R., Adams, W.M., Cooley, A.J., Vail, D.M., 2000. Postoperative radiotherapy for canine soft tissue sarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 14, 578–582.
- Frost, D., Lasota, J., Miettinen, M., 2003. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. *Vet. Pathol.* 40, 42–54. <https://doi.org/10.1354/vp.40-1-42>
- Fulcher, A.S., Szucs, R.A., 1998. Leiomyomatosis peritonealis disseminata complicated by sarcomatous transformation and ovarian torsion: presentation of two cases and review of the literature. *Abdom. Imaging* 23, 640–644.
- Furumoto, R., Michishita, M., Arai, K., Soeta, S., Takahashi, K., 2017. Lingual Chondrolipoma in a Dog. *J. Comp. Pathol.* 157, 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.04.001>
- Gebhard, S., Coindre, J.-M., Michels, J.-J., Terrier, P., Bertrand, G., Trassard, M., Taylor, S., Château, M.-C., Marquès, B., Picot, V., Guillou, L., 2002. Pleomorphic liposarcoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and follow-up analysis of 63 cases: a study from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 601–616.
- Ghadimi, M.P., Liu, P., Peng, T., Bolshakov, S., Young, E.D., Torres, K.E., Colombo, C., Hoffman, A., Broccoli, D., Hornick, J.L., Lazar, A.J., Pisters, P., Pollock, R.E., Lev, D., 2011.

- Pleomorphic liposarcoma: clinical observations and molecular variables. *Cancer* 117, 5359–5369. <https://doi.org/10.1002/cncr.26195>
- Giriyani, S.S., Captain, I., 2013. Pleomorphic Lipoma Masquerading as Malignant Neoplasm 5, 3.
- Goldblum, J.R., Weiss, S.W., Folpe, A.L., 2014a. General Consideration, in: *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. Saunders/Elsevier, Philadelphia, pp. 1–10.
- Goldblum, J.R., Weiss, S.W., Folpe, A.L., 2014b. *Enzinger and Weiss's soft tissue tumors*, 6. ed. ed. Saunders/Elsevier, Philadelphia.
- Goldblum, J.R., Weiss, S.W., Folpe, A.L., 2014c. Liposarcoma, in: *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. Saunders/Elsevier, Philadelphia, pp. 484–523.
- Goldblum, J.R., Weiss, S.W., Folpe, A.L., 2014d. *Enzinger and Weiss's soft tissue tumors*, 6. ed. ed. Saunders/Elsevier, Philadelphia.
- Goldblum, J.R., Weiss, S.W., Folpe, A.L., 2014e. Bening Lipomatuosous tumors, in: *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. Saunders/Elsevier, Philadelphia, pp. 443–483.
- Goldblum, J.R., Weiss, S.W., Folpe, A.L., 2014f. Bening Tumors of Smooth Muscle, in: *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. Saunders/Elsevier, Philadelphia, pp. 524–548.
- Goldblum, J.R., Weiss, S.W., Folpe, A.L., 2014g. Leiomyosarcoma, in: *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. Saunders/Elsevier, Philadelphia, pp. 549–568.
- Graeven, U., Andre, N., Achilles, E., Zornig, C., Schmiegel, W., 1999. Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft-tissue sarcoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125, 577–581.
- Gross, T.L., 2005a. Histiocytic tumors, in: *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis*. Blackwell Science, Oxford, pp. 837–852.
- Gross, T.L., 2005b. Mesenchymal neoplasms and other tumors, in: *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis*. Blackwell Science, Oxford, pp. 709–893.
- Gross, T.L., 2005c. Lipocytic tumors in mesenchymal neoplasms and other tumors, in: *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis*. Blackwell Science, Oxford, pp. 766–777.
- Gross, T.L., 2005d. Fibrous Tumors, in: *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis*. Blackwell Science, Oxford, pp. 710–734.
- Guan, B., Wang, H., Cao, S., Rao, Q., Wang, Y., Zhu, Y., Shi, Q., Yin, H., Wang, X., Zhou, X., 2011. Lipid-rich carcinoma of the breast clinicopathologic analysis of 17 cases. *Ann. Diagn. Pathol.* 15, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2010.10.006>
- Hahn, K.A., Ogilvie, G., Oglivie, G., Rusk, T., Devauchelle, P., Leblanc, A., Legendre, A., Powers, B., Leventhal, P.S., Kinet, J.-P., Palmerini, F., Dubreuil, P., Moussy, A., Hermine, O., 2008. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 1301–1309. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0190.x>
- Hammer, A.S., Williams, B., Dietz, H.H., Hamilton-Dutoit, S.J., 2007. High-throughput immunophenotyping of 43 ferret lymphomas using tissue microarray technology. *Vet. Pathol.* 44, 196–203. <https://doi.org/10.1354/vp.44-2-196>
- Hasegawa, T., Yamamoto, S., Yokoyama, R., Umeda, T., Matsuno, Y., Hirohashi, S., 2002. Prognostic significance of grading and staging systems using MIB-1 score in adult patients with soft tissue sarcoma of the extremities and trunk. *Cancer* 95, 843–851. <https://doi.org/10.1002/cncr.10728>

- Hashimoto, H., Tsuneyoshi, M., Enjoji, M., 1985. Malignant smooth muscle tumors of the retroperitoneum and mesentery: a clinicopathologic analysis of 44 cases. *J. Surg. Oncol.* 28, 177–186.
- Hauser, H., Steindorfer, P., Mischinger, H.J., Beham, A., 1995. 573 Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract—in a ten-year period. *Eur. J. Cancer* 31, S122. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)95827-S](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)95827-S)
- Hayden, D.W., Klausner, J.S., Waters, D.J., 1999. Prostatic leiomyosarcoma in a dog. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 11, 283–286. <https://doi.org/10.1177/104063879901100313>
- Hayes, S., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Gregory-Bryson, E., Kiupel, M., 2013. Classification of canine nonangiogenic, nonlymphogenic, gastrointestinal sarcomas based on microscopic, immunohistochemical, and molecular characteristics. *Vet. Pathol.* 50, 779–788. <https://doi.org/10.1177/0300985813478211>
- Heieck, J.J., Organ, C.H., 1970. Leiomyosarcoma of the scalp in a newborn. *Arch. Dermatol.* 102, 213–215.
- Hendrick, M.J., 2017. Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues, in: *Tumors in Domestic Animals*. Wiley, Ames, Iowa, pp. 142–175.
- Hendrick, M.J. (Ed.), 1998. Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. *Int. Histol. Classif. Tumors Domest. Anim.*
- Heng, H.G., Lowry, J.E., Boston, S., Gabel, C., Ehrhart, N., Gulden, S.M.S., 2006. Smooth muscle neoplasia of the urinary bladder wall in three dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound Off. J. Am. Coll. Vet. Radiol. Int. Vet. Radiol. Assoc.* 47, 83–86.
- Hobert, M.K., Brauer, C., Dziallas, P., Gerhauser, I., Algermissen, D., Tipold, A., Stein, V.M., 2013. Infiltrative lipoma compressing the spinal cord in 2 large-breed dogs. *Can. Vet. J.* 54, 74–78.
- Hoffman, A., Ghadimi, M.P.H., Demicco, E.G., Creighton, C.J., Torres, K., Colombo, C., Peng, T., Lusby, K., Ingram, D., Hornick, J.L., Wang, W.-L., Ravi, V., Lazar, A.J., Lev, D., Pollock, R.E., 2013. Localized and metastatic myxoid/round cell liposarcoma: clinical and molecular observations. *Cancer* 119, 1868–1877. <https://doi.org/10.1002/cncr.27847>
- Holtermann, N., Kiupel, M., Kessler, M., Teske, E., Betz, D., Hirschberger, J., 2016. Masitinib monotherapy in canine epitheliotropic lymphoma. *Vet. Comp. Oncol.* 14 Suppl 1, 127–135. <https://doi.org/10.1111/vco.12157>
- Hornick, J.L., Bosenberg, M.W., Mentzel, T., McMenamin, M.E., Oliveira, A.M., Fletcher, C.D.M., 2004. Pleomorphic liposarcoma: clinicopathologic analysis of 57 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 28, 1257–1267.
- Horvai, A., 2015. Bones, Joints, and Soft Tissue Tumors, in: Abbas, A.K., Kumar, V., Aster, J.C. (Eds.), *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Elsevier, Philadelphia, pp. 1179–1226.
- Ip, P.P.C., Cheung, A.N.Y., Clement, P.B., 2009. Uterine Smooth Muscle Tumors of Uncertain Malignant Potential (STUMP):: A Clinicopathologic Analysis of 16 Cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 33, 992–1005. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181a02d1c>
- Jakimiuk, A.J., Bogusiewicz, M., Tarkowski, R., Dziduch, P., Adamiak, A., Wróbel, A., Haczyński, J., Magoffin, D.A., Jakowicki, J.A., 2004. Estrogen receptor alpha and beta expression in uterine leiomyomas from premenopausal women. *Fertil. Steril.* 82 Suppl 3, 1244–1249. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.130>

- Jensen, M.L., Jensen, O.M., Michalski, W., Nielsen, O.S., Keller, J., 1996. Intradermal and subcutaneous leiomyosarcoma: a clinicopathological and immunohistochemical study of 41 cases. *J. Cutan. Pathol.* 23, 458–463.
- Jensen, V., Høyer, M., Sørensen, F.B., Keller, J., Jensen, O.M., 1996. MIB-1 expression and iododeoxyuridine labelling in soft tissue sarcomas: an immunohistochemical study including correlations with p53, bcl-2 and histological characteristics. *Histopathology* 28, 437–444.
- Johnson, K.A., Powers, B.E., Withrow, S.J., Sheetz, M.J., Curtis, C.R., Wrigley, R.H., 1989. Splenomegaly in dogs. Predictors of neoplasia and survival after splenectomy. *J. Vet. Intern. Med.* 3, 160–166.
- Johnstone, P.A., Laskin, W.B., DeLuca, A.M., Barnes, M., Kinsella, T.J., Sindelar, W.F., 1996. Tumors in dogs exposed to experimental intraoperative radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34, 853–857.
- Jung, I., Gurzu, S., Turdean, S., Ciortea, D., Sahlean, D.I., Golea, M., Bara, T., 2015. Relationship of endothelial area with VEGF-A, COX-2, maspin, c-KIT, and DOG-1 immunoreactivity in liposarcomas versus non-lipomatous soft tissue tumors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 1776–1782.
- Juszczak, M., Klećkowska-Nawrot, J., Pospieszny, N., 2006. Surgical treatment of a urinary bladder leiomyoma in a dog. *Kleintierpraxis* 51, 418–420.
- Kapatkin, A.S., Mullen, H.S., Matthiesen, D.T., Patnaik, A.K., 1992. Leiomyosarcoma in dogs: 44 cases (1983-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201, 1077–1079.
- Katayama, R., Huelsmeyer, M.K., Marr, A.K., Kurzman, I.D., Thamm, D.H., Vail, D.M., 2004. Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54, 25–33. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0780-7>
- Kattan, M.W., Leung, D.H.Y., Brennan, M.F., 2002. Postoperative nomogram for 12-year sarcoma-specific death. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 791–796. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.3.791>
- Kilpatrick, S.E., Mentzel, T., Fletcher, C.D., 1994. Leiomyoma of deep soft tissue. Clinicopathologic analysis of a series. *Am. J. Surg. Pathol.* 18, 576–582.
- Kilvaer, T.K., Valkov, A., Sorbye, S.W., Smeland, E., Bremnes, R.M., Busund, L.-T., Donnem, T., 2011. Fibroblast growth factor 2 orchestrates angiogenic networking in non-GIST STS patients. *J. Transl. Med.* 9, 104. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-104>
- Kökçü, A., Alvur, Y., Bariş, Y.S., Kuşkonmaz, I., 1994. Leiomyomatosis peritonealis disseminata. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 73, 81–83. <https://doi.org/10.3109/00016349409013403>
- Koutras, A., Kotoula, V., Fountzilias, G., 2015. Prognostic and predictive role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in breast cancer. *Pharmacogenomics* 16, 79–94. <https://doi.org/10.2217/pgs.14.148>
- Kumar, S., Chowdhury, N., 2007. Accuracy, limitations and pitfalls in the diagnosis of soft tissue tumors by fine needle aspiration cytology. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 50, 42–45.
- Kumar, S., Witzig, T.E., Rajkumar, S.V., 2004. Thalidomid: current role in the treatment of non-plasma cell malignancies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22, 2477–2488. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.10.127>
- Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C., 2015. Neoplasia, in: *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Elsevier, Philadelphia, pp. 265–340.

- Kuntz, C.A., Dernell, W.S., Powers, B.E., Devitt, C., Straw, R.C., Withrow, S.J., 1997. Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 211, 1147–1151.
- La Rosa, S., Finzi, G., Puppa, G., Capella, C., 2010. Lipid-rich variant of appendiceal well-differentiated endocrine tumor (carcinoid). *Am. J. Clin. Pathol.* 133, 809–814. <https://doi.org/10.1309/AJCP0NWA1DBDZIOY>
- LaDouceur, E.E.B., Stevens, S.E., Wood, J., Reilly, C.M., 2017. Immunoreactivity of Canine Liposarcoma to Muscle and Brown Adipose Antigens. *Vet. Pathol.* 54, 885–891. <https://doi.org/10.1177/0300985817723691>
- Lamagna, B., Greco, A., Guardascione, A., Navas, L., Ragozzino, M., Paciello, O., Brunetti, A., Meomartino, L., 2012. Canine Lipomas Treated with Steroid Injections: Clinical Findings. *PLOS ONE* 7, e50234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050234>
- Larbcharoensub, N., Limprasert, V., Pangpunyakulchai, D., Sanpaphant, S., Wiratkapun, C., Kijvikai, K., 2017. Renal Leiomyoma: A Case Report and Review of the Literature. *Urol. Case Rep.* 13, 3–5. <https://doi.org/10.1016/j.eucr.2017.03.018>
- LaRock, R.G., Ginn, P.E., 1997. Immunohistochemical staining characteristics of canine gastrointestinal stromal tumors. *Vet. Pathol.* 34, 303–311. <https://doi.org/10.1177/030098589703400406>
- Lazar, A.J., Evans, H.L., Shipley, J., 2013. Leiomyosarcoma in Smooth-muscle tumours, in: Fletcher, D.M.C., Organizzazione mondiale della sanità, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Eds.), *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 111–113.
- Liggett, A.D., Frazier, K.S., Styer, E.L., 2002. Angiolipomatous tumors in dogs and a cat. *Vet. Pathol.* 39, 286–289. <https://doi.org/10.1354/vp.39-2-286>
- Lim, D., Alvarez, T., Nucci, M.R., Gilks, B., Longacre, T., Soslow, R.A., Oliva, E., 2013. Interobserver Variability in the Interpretation of Tumor Cell Necrosis in Uterine Leiomyosarcoma: *Am. J. Surg. Pathol.* 37, 650–658. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182851162>
- Lin, X.-Y., Wang, Y., Liu, Y., Sun, Y., Miao, Y., Zhang, Y., Yu, J.-H., Wang, E.-H., 2012. Pleomorphic lipoma lacking mature fat component in extensive myxoid stroma: a great diagnostic challenge. *Diagn. Pathol.* 7, 155. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-155>
- Liptak, J.M., Dernell, W.S., Ehrhart, E.J., Rizzo, S.A., Rooney, M.B., Withrow, S.J., 2004. Retroperitoneal sarcomas in dogs: 14 cases (1992-2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224, 1471–1477.
- Liptak, J.M., Forrest, L.J., 2013. Soft tissue sarcomas, in: Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L. (Eds.), *Withrow & MacEwens Small Animal Clinical Oncology*. Saunders Elsevier, St. Louis (Mo.), pp. 356–380.
- Liu, S.M., Mikaelian, I., 2003. Cutaneous smooth muscle tumors in the dog and cat. *Vet. Pathol.* 40, 685–692. <https://doi.org/10.1354/vp.40-6-685>
- Liu, W., Jiang, Q., Zhou, Y., 2018. Advances of systemic treatment for adult soft-tissue sarcoma. *Chin. Clin. Oncol.* 7. <https://doi.org/10.21037/cco.v7i4.21034>
- Lucas, D.R., Nascimento, A.G., Sanjay, B.K., Rock, M.G., 1994. Well-differentiated liposarcoma. The Mayo Clinic experience with 58 cases. *Am. J. Clin. Pathol.* 102, 677–683.

- Ly, A., Mills, A.M., McKenney, J.K., Balzer, B.L., Kempson, R.L., Hendrickson, M.R., Longacre, T.A., 2013. Atypical leiomyomas of the uterus: a clinicopathologic study of 51 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 37, 643–649. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182893f36>
- Ma, R.M., Chen, C.Z., Lin, C.Q., Zhang, W., Guo, G.L., 2016. [Lack of progesterone receptor expression predicts poor prognosis in patients with operable ER-positive invasive breast cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 38, 687–692. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2016.09.010>
- Maeda, K., Chung, Y.S., Ogawa, Y., Takatsuka, S., Kang, S.M., Ogawa, M., Sawada, T., Sowa, M., 1996. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 77, 858–863.
- Magas, M., Szczepańska, K., Jankowski, M., Bukowska, D., Antosik, P., 2018. Splenic Leiomyoma in Dog. *Med. J. Cell Biol.* 6, 8–12. <https://doi.org/10.2478/acb-2018-0002>
- Mancikova, V., Inglada-Pérez, L., Curras-Freixes, M., de Cubas, A.A., Gómez, Á., Letón, R., Kersten, I., Leandro-García, L.J., Comino-Méndez, I., Apellaniz-Ruiz, M., Sánchez, L., Cascón, A., Sastre-Marcos, J., García, J.F., Rodríguez-Antona, C., Robledo, M., 2014. VEGF, VEGFR3, and PDGFRB protein expression is influenced by RAS mutations in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 24, 1251–1255. <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0579>
- Maniscalco, L., Iussich, S., Morello, E., Martano, M., Biolatti, B., Riondato, F., Della Salda, L., Romanucci, M., Malatesta, D., Bongiovanni, L., Tirrito, F., Gattino, F., Buracco, P., De Maria, R., 2013. PDGFs and PDGFRs in canine osteosarcoma: new targets for innovative therapeutic strategies in comparative oncology. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 195, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.05.003>
- Mantovani, F.B., Morrison, J.A., Mutsaers, A.J., 2016. Effects of epidermal growth factor receptor kinase inhibition on radiation response in canine osteosarcoma cells. *BMC Vet. Res.* 12. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0707-7>
- Matsuyama, A., Hisaoka, M., Hashimoto, H., 2007. Angioleiomyoma: a clinicopathologic and immunohistochemical reappraisal with special reference to the correlation with myopericytoma. *Hum. Pathol.* 38, 645–651. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.10.012>
- Mavrogenis, A.F., Lesensky, J., Romagnoli, C., Alberghini, M., Letson, G.D., Ruggieri, P., 2011. Atypical Lipomatous Tumors/Well-differentiated Liposarcomas: Clinical Outcome of 67 Patients. *Orthopedics* 34, e893–e898. <https://doi.org/10.3928/01477447-20111021-11>
- McCarthy, C.J., O'Brien, G.C., Cummins, R.J., Kay, E.W., Broe, P.J., 2010. GIST with a twist—upregulation of PDGF-B resulting in metachronous gastrointestinal stromal tumor and dermatofibrosarcoma protuberans. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 14, 398–403. <https://doi.org/10.1007/s11605-009-1088-z>
- McCarthy, P.E., Hedlund, C.S., Veazy, R.S., Prescott-Mathews, J., Cho, D.Y., 1996. Liposarcoma associated with a glass foreign body in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 612–614.
- Mcchesney, A.E., Stephens, L.C., Lebel, J., Snyder, S., Ferguson, H.R., 1980. Infiltrative Lipoma in Dogs. *Vet. Pathol.* 17, 316–322. <https://doi.org/10.1177/030098588001700305>
- McEntee, M.C., Page, R.L., Mauldin, G.N., Thrall, D.E., 2000. Results of irradiation of infiltrative lipoma in 13 dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound Off. J. Am. Coll. Vet. Radiol. Int. Vet. Radiol. Assoc.* 41, 554–556.

- McKnight, J.A., Mauldin, G.N., McEntee, M.C., Meleo, K.A., Patnaik, A.K., 2000. Radiation treatment for incompletely resected soft-tissue sarcomas in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 205–210.
- McSporran, K.D., 2009. Histologic Grade Predicts Recurrence for Marginally Excised Canine Subcutaneous Soft Tissue Sarcomas. *Vet. Pathol.* 46, 928–933. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0277-M-FL>
- Meuten, D.J., Moore, F.M., George, J.W., 2016. Mitotic Count and the Field of View Area: Time to Standardize. *Vet. Pathol.* 53, 7–9. <https://doi.org/10.1177/0300985815593349>
- Michajłowski, I., Błażewicz, I., Karpinsky, G., Sobjanek, M., Nowicki, R., 2015. Successful treatment of multiple cutaneous leiomyomas with carbon dioxide laser ablation. *Adv. Dermatol. Allergol. Dermatol. Alergol.* 32, 480–482. <https://doi.org/10.5114/pdia.2015.48058>
- Miettinen, M., 2014. Smooth muscle tumors of soft tissue and non-uterine viscera: biology and prognosis. *Mod. Pathol.* 27, S17–S29. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.178>
- Miettinen, M., Makhlof, H., Sobin, L.H., Lasota, J., 2006. Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. *Am. J. Surg. Pathol.* 30, 477–489.
- Miettinen, M., Sarlomo-Rikala, M., Sobin, L.H., Lasota, J., 2000. Esophageal stromal tumors: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 17 cases and comparison with esophageal leiomyomas and leiomyosarcomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 24, 211–222.
- Millán, Y., Gordon, A., de los Monteros, A.E., Reymundo, C., de las Mulas, J.M., 2007. Steroid Receptors in Canine and Human Female Genital Tract Tumours with Smooth Muscle Differentiation. *J. Comp. Pathol.* 136, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.01.004>
- Milovancev, M., Helfand, S.C., Marley, K., Goodall, C.P., Löhr, C.V., Bracha, S., 2016. Antiproliferative effects of masitinib and imatinib against canine oral fibrosarcoma in vitro. *BMC Vet. Res.* 12. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0712-x>
- Muratori, F., Frenos, F., Bettini, L., Matera, D., Mondanelli, N., Scorianz, M., Cuomo, P., Scoccianti, G., Beltrami, G., Greto, D., Livi, L., Baldi, G., Roselli, G., Capanna, R., Campanacci, D.A., 2018. Liposarcoma: Clinico-pathological analysis, prognostic factors and survival in a series of 307 patients treated at a single institution. *J. Orthop. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jos.2018.06.008>
- Muscatello, L.V., Sarli, G., Beha, G., Asproni, P., Millanta, F., Poli, A., De Tolla, L.J., Benazzi, C., Brunetti, B., 2015. Validation of tissue microarray for molecular profiling of canine and feline mammary tumours. *J. Comp. Pathol.* 152, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.12.014>
- Mutinelli, F., Vascellari, M., Melchiotti, E., Bigolaro, M., Bozzato, E., 2007. Intra-pelvic chondrolipoma in a dog. *J. Comp. Pathol.* 137, 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.06.006>
- Nagano, S., Yokouchi, M., Setoguchi, T., Ishidou, Y., Sasaki, H., Shimada, H., Komiya, S., 2015. Differentiation of lipoma and atypical lipomatous tumor by a scoring system: implication of increased vascularity on pathogenesis of liposarcoma. *BMC Musculoskelet. Disord.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12891-015-0491-8>
- Nayal, B., Somal, P.K., Rao, A.C., Kumar, P., 2016. Uterine lipoleiomyoma: A case report of a rare entity. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* 6, 134–136. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.179029>

- Neuwirth, R.S., Moritz, J.L., 2009. Leiomyomas of the Uterus. *Glob. Libr. Womens Med.* <https://doi.org/10.3843/GLOWM.10007>
- Norris, A.M., Laing, E.J., Valli, V.E., Withrow, S.J., Macy, D.W., Ogilvie, G.K., Tomlinson, J., McCaw, D., Pidgeon, G., Jacobs, R.M., 1992. Canine bladder and urethral tumors: a retrospective study of 115 cases (1980-1985). *J. Vet. Intern. Med.* 6, 145–153.
- Nystrom, L.M., Reimer, N.B., Reith, J.D., Dang, L., Zlotecki, R.A., Scarborough, M.T., Gibbs, C.P., 2013. Multidisciplinary Management of Soft Tissue Sarcoma. *Sci. World J.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/852462>
- Obermair, A., Speiser, P., Reisenberger, K., Ullrich, R., Czerwenka, K., Kaider, A., Zeillinger, R., Miksche, M., 1998. Influence of intratumoral basic fibroblast growth factor concentration on survival in ovarian cancer patients. *Cancer Lett.* 130, 69–76.
- Oliva, E., Carcangiu, M.L., Carinelli, S., Ip, P.P.C., Loening, T., Nucci, M., Prat, J., Zaloudek, C., 2014. Mesenchymal tumours, in: *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. pp. 135–147.
- Orellana-Díaz, O., Hernández-Pérez, E., 1983. Leiomyoma cutis and leiomyosarcoma: a 10-year study and a short review. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 9, 283–287.
- Paal, E., Miettinen, M., 2001. Retroperitoneal leiomyomas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 56 cases with a comparison to retroperitoneal leiomyosarcomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 25, 1355–1363.
- Palman, C., Bowen-Pope, D.F., Brooks, J.J., 1992. Platelet-derived growth factor receptor (beta-subunit) immunoreactivity in soft tissue tumors. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 66, 108–115.
- Palmieri, C., 2015. Immunohistochemical Expression of Angiogenic Factors by Neoplastic Epithelial Cells Is Associated With Canine Prostatic Carcinogenesis. *Vet. Pathol.* 52, 607–613. <https://doi.org/10.1177/0300985814549951>
- Parsons, M., Grabsch, H., 2009. How to make tissue microarrays. *Diagn. Histopathol., Mini-Symposium: Pathology of Bone Marrow Disorders* 15, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2009.01.010>
- Patnaik, A.K., Hurvitz, A.I., Johnson, G.F., 1977. Canine gastrointestinal neoplasms. *Vet. Pathol.* 14, 547–555. <https://doi.org/10.1177/030098587701400602>
- Patnaik, A.K., Liu, S.K., 1975. Leiomyoma of the tunica vaginalis in a dog. *Cornell Vet.* 65, 228–231.
- Pellegrino, V., Muscatello, L.V., Sarli, G., Avallone, G., 2018. Canine Gastrointestinal Spindle Cell Tumors Efficiently Diagnosed by Tissue Microarray-Based Immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 55, 678–681. <https://doi.org/10.1177/0300985818777793>
- Perrone, F., Da Riva, L., Orsenigo, M., Losa, M., Jocolle, G., Millefanti, C., Pastore, E., Gronchi, A., Pierotti, M.A., Pilotti, S., 2009. PDGFRA, PDGFRB, EGFR, and downstream signaling activation in malignant peripheral nerve sheath tumor. *Neuro-Oncol.* 11, 725–736. <https://doi.org/10.1215/15228517-2009-003>
- Pessina, P., Castillo, V., Sartore, I., Borrego, J., Meikle, A., 2016. Semiquantitative immunohistochemical marker staining and localization in canine thyroid carcinoma and normal thyroid gland. *Vet. Comp. Oncol.* 14, e102-112. <https://doi.org/10.1111/vco.12111>
- Pisters, P.W., 1998. Combined modality treatment of extremity soft tissue sarcomas. *Ann. Surg. Oncol.* 5, 464–472.

- Radi, Z.A., 2005. Vulvar lipoleiomyoma in a dog. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 17, 89–90. <https://doi.org/10.1177/104063870501700121>
- Ramírez, G.A., Altimira, J., García, B., Vilafranca, M., 2010. Chondro-osteoblastic Metaplasia in Canine Benign Cutaneous Lipomas. *J. Comp. Pathol.* 142, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.06.007>
- Ramos, E.A.S., Silva, C.T. da, Manica, G.C.M., Pereira, I.T., Klassen, L.M.B., Ribeiro, E.M.S.F., Cavalli, I.J., Braun-Prado, K., Lima, R.S., Urban, C.A., Costa, F.F., Noronha, L. de, Klassen, G., Ramos, E.A.S., Silva, C.T. da, Manica, G.C.M., Pereira, I.T., Klassen, L.M.B., Ribeiro, E.M.S.F., Cavalli, I.J., Braun-Prado, K., Lima, R.S., Urban, C.A., Costa, F.F., Noronha, L. de, Klassen, G., 2016. Worse prognosis in breast cancer patients can be predicted by immunohistochemical analysis of positive MMP-2 and negative estrogen and progesterone receptors. *Rev. Assoc. Médica Bras.* 62, 774–781. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.62.08.774>
- Ranchod, M., Kempson, R.L., 1977. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneum: a pathologic analysis of 100 cases. *Cancer* 39, 255–262.
- Ranen, E., Lavy, E., Aizenberg, I., Perl, S., Harrus, S., 2004. Spirocercosis-associated esophageal sarcomas in dogs. *Vet. Parasitol.* 119, 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.023>
- Rao, U.N., Finkelstein, S.D., Jones, M.W., 1999. Comparative immunohistochemical and molecular analysis of uterine and extrauterine leiomyosarcomas. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 12, 1001–1009.
- Rauh-Hain, J.A., del Carmen, M.G., 2013. Endometrial stromal sarcoma: a systematic review. *Obstet. Gynecol.* 122, 676–683. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3182a189ac>
- Ravi, M., Schobert, C.S., Kiupel, M., Dubielzig, R.R., 2014. Clinical, morphologic, and immunohistochemical features of canine orbital hibernomas. *Vet. Pathol.* 51, 563–568. <https://doi.org/10.1177/0300985813493913>
- Riddell, R.H. (Ed.), 2003. Tumors of the intestines. Armed forces institute of pathology, Washington (DC).
- Ruka, W., Rutkowski, P., Kaminska, J., Rysinska, A., Steffen, J., 2001. Alterations of routine blood tests in adult patients with soft tissue sarcomas: relationships to cytokine serum levels and prognostic significance. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 12, 1423–1432.
- Russell, K.N., Mehler, S.J., Skorupski, K.A., Baez, J.L., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H., 2007. Clinical and immunohistochemical differentiation of gastrointestinal stromal tumors from leiomyosarcomas in dogs: 42 cases (1990-2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, 1329–1333. <https://doi.org/10.2460/javma.230.9.1329>
- Rutkowski, P., Kaminska, J., Kowalska, M., Ruka, W., Steffen, J., 2002. Cytokine serum levels in soft tissue sarcoma patients: correlations with clinico-pathological features and prognosis. *Int. J. Cancer* 100, 463–471. <https://doi.org/10.1002/ijc.10496>
- Sachdeva, M.P., Goldblum, J.R., Rubin, B.P., Billings, S.D., 2009. Low-fat and fat-free pleomorphic lipomas: a diagnostic challenge. *Am. J. Dermatopathol.* 31, 423–426. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e3181a129b7>
- Salam, G.A., 2002. Lipoma excision. *Am. Fam. Physician* 65, 901–904.
- Sant'Ana, F., Serakides, R., Nascimento, E.F., 2000. Leiomyoma of the gall bladder in a dog. *Arq. Bras. Med. Vet. E Zootec.* 52, 23–24.

- Sato, T., Aoki, K., Shibuya, H., Machida, T., Watari, T., 2003. Leiomyosarcoma of the kidney in a dog. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50, 366–369.
- Schweiger, N., Hauck, M., Steinhoff, H., Sampl, S., Reifinger, M., Walter, I., Kreilmeier, T., Marian, B., Grusch, M., Berger, W., Holzmann, K., Kleiter, M., 2015a. Canine and human sarcomas exhibit predominant FGFR1 expression and impaired viability after inhibition of signaling. *Mol. Carcinog.* 54, 841–852. <https://doi.org/10.1002/mc.22155>
- Schweiger, N., Hauck, M., Steinhoff, H., Sampl, S., Reifinger, M., Walter, I., Kreilmeier, T., Marian, B., Grusch, M., Berger, W., Holzmann, K., Kleiter, M., 2015b. Canine and human sarcomas exhibit predominant FGFR1 expression and impaired viability after inhibition of signaling. *Mol. Carcinog.* 54, 841–852. <https://doi.org/10.1002/mc.22155>
- Scurr, M., 2011. Histology-driven chemotherapy in soft tissue sarcomas. *Curr. Treat. Options Oncol.* 12, 32–45. <https://doi.org/10.1007/s11864-011-0140-x>
- Seely, J.C., Cosenza, S.F., Montgomery, C.A., 1978. Leiomyosarcoma of the canine urinary bladder, with metastases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172, 1427–1429.
- Selting, K., 2013. Intestinal tumors, in: Withrow & MacEwens Small Animal Clinical Oncology. Saunders Elsevier, St. Louis (Mo.), pp. 412–423.
- Shapiro, A., Ferenczy, A., Turcotte, R., Bruchim, I., Gotlieb, W.H., 2004. Uterine smooth-muscle tumor of uncertain malignant potential metastasizing to the humerus as a high-grade leiomyosarcoma. *Gynecol. Oncol.* 94, 818–820. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.05.049>
- Sharma, P., Chaturvedi, K.U., Gupta, R., Nigam, S., 2004. Leiomyomatosis peritonealis disseminata with malignant change in a post-menopausal woman. *Gynecol. Oncol.* 95, 742–745. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.09.007>
- Shim, M., Song, C., Park, S., Choi, S.-K., Cho, Y.M., Kim, C.-S., Ahn, H., 2015. Prognostic significance of platelet-derived growth factor receptor- β expression in localized clear cell renal cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141, 2213–2220. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-2019-x>
- Singer, S., Gronchi, A., 2013. Clinical features in Tumours of soft tissue: Introduction, in: Fletcher, D.M.C., Organizzazione mondiale della sanità, Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Eds.), WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 15–16.
- Singh, R., Basturk, O., Klimstra, D.S., Zamboni, G., Chetty, R., Hussain, S., La Rosa, S., Yilmaz, A., Capelli, P., Capella, C., Cheng, J.D., Adsay, N.V., 2006. Lipid-rich variant of pancreatic endocrine neoplasms. *Am. J. Surg. Pathol.* 30, 194–200.
- Singhal, S., Mehta, J., Desikan, R., Ayers, D., Roberson, P., Eddlemon, P., Munshi, N., Anaissie, E., Wilson, C., Dhodapkar, M., Zeddis, J., Barlogie, B., 1999. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 341, 1565–1571. <https://doi.org/10.1056/NEJM199911183412102>
- Sinibaldi, K., Rosen, H., Liu, S.K., DeAngelis, M., 1976. Tumors associated with metallic implants in animals. *Clin. Orthop.* 257–266.
- Smith, C.A., Martinez, S.R., Tseng, W.H., Tamurian, R.M., Bold, R.J., Borys, D., Canter, R.J., 2012. Predicting survival for well-differentiated liposarcoma: the importance of tumor location. *J. Surg. Res.* 175, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.07.024>
- Spencer, J.M., Amonette, R.A., 1996. Tumors with smooth muscle differentiation. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. AI* 22, 761–768.

- Spitzbarth, I., Heinrich, F., Herder, V., Recker, T., Wohlsein, P., Baumgärtner, W., 2017. Canine Central Nervous System Neoplasm Phenotyping Using Tissue Microarray Technique. *Vet. Pathol.* 54, 369–379. <https://doi.org/10.1177/0300985816688745>
- Stefanello, D., Morello, E., Roccabianca, P., Iussich, S., Nassuato, C., Martano, M., Squassino, C., Avallone, G., Romussi, S., Buracco, P., 2008. Marginal excision of low-grade spindle cell sarcoma of canine extremities: 35 dogs (1996-2006). *Vet. Surg.* VS 37, 461–465. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2008.00408.x>
- Stuckey, J.A., Rankin, A.J., Romkes, G., Slack, J., Kiupel, M., Dubielzig, R.R., 2015. Subconjunctival hibernoma in a dog. *Vet. Ophthalmol.* 18, 78–82. <https://doi.org/10.1111/vop.12124>
- Su, C.-H., Hung, J.-K., Chang, I.-L., 2011. Surgical Treatment of Intramuscular, Infiltrating Lipoma. *Int. Surg.* 96, 56–59. <https://doi.org/10.9738/1396.1>
- Suzuki, S., Uchida, K., Nakayama, H., 2014. The effects of tumor location on diagnostic criteria for canine malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) and the markers for distinction between canine MPNSTs and canine perivascular wall tumors. *Vet. Pathol.* 51, 722–736. <https://doi.org/10.1177/0300985813501336>
- Svarvar, C., Böhling, T., Berlin, O., Gustafson, P., Follerås, G., Bjerkehagen, B., Domanski, H.A., Sundby Hall, K., Tukiainen, E., Blomqvist, C., Scandinavian Sarcoma Group Leiomyosarcoma Working Group, 2007. Clinical course of nonvisceral soft tissue leiomyosarcoma in 225 patients from the Scandinavian Sarcoma Group. *Cancer* 109, 282–291. <https://doi.org/10.1002/cncr.22395>
- Swann, H.M., Holt, D.E., 2002. Canine gastric adenocarcinoma and leiomyosarcoma: a retrospective study of 21 cases (1986-1999) and literature review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 38, 157–164. <https://doi.org/10.5326/0380157>
- Sycamore, K.F., Julian, A.F., 2011. Lipoleiomyoma of the reproductive tract in a Huntaway bitch. *N. Z. Vet. J.* 59, 244–247. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.596181>
- Taeger, J., Moser, C., Hellerbrand, C., Mycielska, M.E., Glockzin, G., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., Stoeltzing, O., Lang, S.A., 2011. Targeting FGFR/PDGFR/VEGFR impairs tumor growth, angiogenesis, and metastasis by effects on tumor cells, endothelial cells, and pericytes in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.* 10, 2157–2167. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0312>
- Takanami, I., Tanaka, F., Hashizume, T., Kodaira, S., 1997. Vascular endothelial growth factor and its receptor correlate with angiogenesis and survival in pulmonary adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 17, 2811–2814.
- Thacher, C., Bradley, R.L., 1983. Vulvar and vaginal tumors in the dog: a retrospective study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183, 690–692.
- Thompson, J.J., Morrison, J.A., Pearl, D.L., Boston, S.E., Wood, G.A., Foster, R.A., Coomber, B.L., 2016. Receptor Tyrosine Kinase Expression Profiles in Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Vet. Pathol.* 53, 545–558. <https://doi.org/10.1177/0300985815610388>
- Thomson, M.J., Withrow, S.J., Dernell, W.S., Powers, B.E., 1999. Intermuscular lipomas of the thigh region in dogs: 11 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 165–167. <https://doi.org/10.5326/15473317-35-2-165>

- Thrall, D.E., Goldschmidt, M.H., Biery, D.N., 1981. Malignant tumor formation at the site of previously irradiated acanthomatous epulides in four dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178, 127–132.
- Toi, M., Matsumoto, T., Bando, H., 2001. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol.* 2, 667–673. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00556-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00556-3)
- Trojani, M., Contesso, G., Coindre, J.M., Rouesse, J., Bui, N.B., de Mascarel, A., Goussot, J.F., David, M., Bonichon, F., Lagarde, C., 1984. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int. J. Cancer* 33, 37–42.
- Valesky, M., Spang, A.J., Fisher, G.W., Farkas, D.L., Becker, D., 2002. Noninvasive dynamic fluorescence imaging of human melanomas reveals that targeted inhibition of bFGF or FGFR-1 in melanoma cells blocks tumor growth by apoptosis. *Mol. Med. Camb. Mass* 8, 103–112.
- Valkov, A., Sorbye, S., Kilvaer, T.K., Donnem, T., Smeland, E., Bremnes, R.M., Busund, L.-T., 2011. Estrogen receptor and progesterone receptor are prognostic factors in soft tissue sarcomas. *Int. J. Oncol.* 38, 1031–1040. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.920>
- Valli, F., Bienzle, D., Meuten, D., Linder, K.E., 2017. Tumors of the Hemolymphatic System, in: *Tumors in Domestic Animals*. Wiley, Ames, Iowa, pp. 203–321.
- Verheul, H.M., Hoekman, K., Lupu, F., Broxterman, H.J., van der Valk, P., Kakkar, A.K., Pinedo, H.M., 2000. Platelet and coagulation activation with vascular endothelial growth factor generation in soft tissue sarcomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 166–171.
- Wang, L., Li, J., Zheng, Z., Liu, H., Du, G., Li, S., 2004. Antitumor activities of a novel indolin-2-ketone compound, Z24: more potent inhibition on bFGF-induced angiogenesis and bcl-2 over-expressing cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 502, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.048>
- Wang, L., Liu, Y., Zhang, D., Zhang, Y., Tang, N., Wang, E.-H., 2013. A case of ‘fat-free’ pleomorphic lipoma occurring in the upper back and axilla simultaneously. *World J. Surg. Oncol.* 11, 145. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-145>
- Wang, L., Luo, R., Xiong, Z., Xu, J., Fang, D., 2018. Pleomorphic liposarcoma. *Medicine (Baltimore)* 97. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009986>
- Weiss, S.W., 2002. Smooth muscle tumors of soft tissue. *Adv. Anat. Pathol.* 9, 351–359.
- Weiss, S.W., Rao, V.K., 1992. Well-differentiated liposarcoma (atypical lipoma) of deep soft tissue of the extremities, retroperitoneum, and miscellaneous sites. A follow-up study of 92 cases with analysis of the incidence of “dedifferentiation.” *Am. J. Surg. Pathol.* 16, 1051–1058.
- Williamson, M.M., Middleton, D.J., 1998. Cutaneous soft tissue tumours in dogs: classification, differentiation, and histogenesis. *Vet. Dermatol.* 9, 43–48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.1998.00076.x>
- Wohlsein, P., Recker, T., Rohn, K., Baumgärtner, W., 2012. Validation of usefulness of tissue microarray technology in primary tumours of the canine and feline central nervous system. *J. Comp. Pathol.* 146, 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.08.006>
- Woldemeskel, M., Whatley, S.D., 2008. Subcutaneous osteolipoma and chondrolipoma each in different two dogs. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 115, 343–345. <https://doi.org/10.2376/0341-6593-115-343>

- Yang, C.H., Lee, J.N., Hsu, S.C., Kuo, C.H., Tsai, E.M., 2002. Effect of hormone replacement therapy on uterine fibroids in postmenopausal women--a 3-year study. *Maturitas* 43, 35–39.
- Yap, F.W., Rasotto, R., Priestnall, S.L., Parsons, K.J., Stewart, J., 2017. Intra- and inter-observer agreement in histological assessment of canine soft tissue sarcoma. *Vet. Comp. Oncol.* 15, 1553–1557. <https://doi.org/10.1111/vco.12300>
- Yonemaru, K., Sakai, H., Murakami, M., Yanai, T., Masegi, T., 2006. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptors (flt-1, flk-1, and flg-1) in canine vascular tumors. *Vet. Pathol.* 43, 971–980. <https://doi.org/10.1354/vp.43-6-971>
- Yoon, S.S., Segal, N.H., Olshen, A.B., Brennan, M.F., Singer, S., 2004. Circulating angiogenic factor levels correlate with extent of disease and risk of recurrence in patients with soft tissue sarcoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 15, 1261–1266. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh309>
- Yoon, S.S., Stangenberg, L., Lee, Y.-J., Rothrock, C., Dreyfuss, J.M., Baek, K.-H., Waterman, P.R., Nielsen, G.P., Weissleder, R., Mahmood, U., Park, P.J., Jacks, T., Dodd, R.D., Fisher, C.J., Ryeom, S., Kirsch, D.G., 2009. Efficacy of Sunitinib and Radiotherapy in Genetically Engineered Mouse Model of Soft-tissue Sarcoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 74, 1207–1216. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.02.052>
- Zhang, J., Chen, T., Mao, Q., Lin, J., Jia, J., Li, S., Xiong, W., Lin, Y., Liu, Z., Liu, X., Zhao, H., Wang, G., Zheng, D., Qiu, S., Ge, J., 2015. PDGFR- β -activated ACK1-AKT signaling promotes glioma tumorigenesis. *Int. J. Cancer* 136, 1769–1780. <https://doi.org/10.1002/ijc.29234>