



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

Progetto Dottorati FSE XXXV Ciclo Unime

Settore Scientifico disciplinare: VET/08 – VET/03

Tumori mammari negli animali da compagnia: microambiente tumorale e prospettive terapeutiche

Dottorando:

Dott.ssa Stefania Di Giorgio

Coordinatore Dottorato: **Chiar.ma Prof.ssa Rosaria Laurà**

Tutor: **Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta Giudice**

Co-tutor: **Chiar.ma Prof.ssa Alessandra Sfacteria**

Anno Accademico 2021/2022

Indice

| | |
|---|-----------|
| Summary | 5 |
| Capitolo 1 | 6 |
| INTRODUZIONE | 6 |
| Tumori mammari nel cane | 6 |
| Tumori mammari nel gatto | 7 |
| INFIAMMAZIONE, TUMORE E MICROAMBIENTE STROMALE | 9 |
| TILs & TLS | 12 |
| Aven | 20 |
| Eritropoietina | 21 |
| Mastociti e triptasi | 22 |
| Macrofagi | 24 |
| Linfociti CD3+ | 26 |
| Immunoglobuline e cellule B | 27 |
| IMMUNOTERAPIA | 29 |
| Capitolo 2 | 31 |
| TUMORI DELLA GHIANDOLA MAMMARIA DEL GATTO | 31 |
| Classificazione istologica | 31 |
| Grading istologico | 35 |
| NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO NELLA FAC DEL GATTO | 38 |
| Materiali e metodi | 39 |
| Risultati | 42 |
| Discussioni e conclusioni | 43 |
| TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES (TILS) NEI TUMORI MAMMARI DEL GATTO: SIGNIFICATO E POSSIBILI RISVOLTI TERAPEUTICI | 45 |
| Materiali e metodi | 45 |
| Risultati | 47 |
| Discussioni e conclusioni | 49 |
| Capitolo 3 | 51 |
| TUMORI DELLA GHIANDOLA MAMMARIA DEL CANE | 51 |
| Classificazione istologica dei tumori mammari della cagna | 51 |
| Grading istologico | 54 |

| | |
|--|-------------------|
| <i>STRUTTURE TERZIARIE LINFOIDI (TLS) NEI TUMORI MAMMARI DEL CANE: SIGNIFICATO E POSSIBILI RISVOLTI TERAPEUTICI.....</i> | <i>56</i> |
| <i>Materiali e metodi.....</i> | <i>56</i> |
| <i>Risultati</i> | <i>58</i> |
| <i>Discussioni.....</i> | <i>64</i> |
| <i>Conclusioni</i> | <i>69</i> |
| | |
| <i>VALUTAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE DEI TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES (TILS) E TERTIARY LYMPHOID STRUCTURES (TLS) NEI TUMORI MAMMARI DEL CANE.....</i> | <i>71</i> |
| <i>Materiali e metodi.....</i> | <i>71</i> |
| <i>Risultati</i> | <i>73</i> |
| <i>Discussioni e conclusioni</i> | <i>75</i> |
| | |
| <i>BIBLIOGRAFIA.....</i> | <i>77</i> |
| | |
| <i>APPENDICE I.....</i> | <i>106</i> |
| | |
| <i>APPENDICE II.....</i> | <i>107</i> |

Summary

Mammary tumours are common in intact bitches and queen. Diagnosis, confirmed by histopathology and, if necessary, immunohistochemistry, is important in determining treatment and prognosis.

The elective treatment is surgery, which aims to remove the tumour with clean margins and, depending on the case, to prevent the development of new tumours in the remaining glands. Adjuvant therapy may include chemotherapy and immunotherapy.

In recent years, it has become clear how tumours and the tumour microenvironment represent spatially organised “ecosystems”, where tumour cells and the immune cells of the different compartments (stromal, intratumoral and peritumoral), are in dynamic interaction, with a potential clinical impact. For this reason, the aim of this doctoral thesis is to investigate the prognostic significance of the inflammatory infiltrate in canine and feline mammary tumours through the study of the tumor- infiltrating lymphocytes (TILs) and tertiary lymphoid structures (TLSs) to obtain useful information for understanding the behaviour of the neoplasm that could be useful for collecting prognostic data and set up therapeutic protocols. Results suggest that the distribution of TILs and TLSs in the tumour compartment (stromal, intratumoral and peritumoral) may have different prognostic values in mammary simple carcinomas.

Among cat mammary lesions, the so-called fibroadenomatous change (FAC), a hyperplastic/dysplastic lesion of the feline mammary gland, is frequently encountered in clinical practice; although non-neoplastic and non-malignant, FAC is painful and disabling for the patient. In this thesis, a new therapeutic protocol for the treatment of FAC is described, involving a combination of drugs designed to preserve mammary gland integrity, even in pregnant queens.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

I tumori mammari sono più comuni nel cane che in ogni altra specie animale. La percentuale di neoplasie mammarie maligne è di circa il 50% - nel cane (Moe 2001, Salas et al., 2015, Goldschmidt et al., 2011, Sorenmo et al., 2011) e dell'80% - 90% nel gatto (Hayes, 1981); circa l'1% riguarda i maschi. In entrambe le specie (cane e gatto) l'incidenza tende ad aumentare con l'età ed è più elevata nelle femmine intere che nelle femmine sterilizzate, mentre nei maschi è irrilevante. L'eziologia dei tumori mammari degli animali è sconosciuta, anche se una concreta influenza sul loro sviluppo è esercitata certamente dagli ormoni ovarici, come dimostra la drastica riduzione dell'incidenza nelle cagne sterilizzate in età prepubere.

Tumori mammari nel cane

I tumori mammari della cagna (CMTs) sono i secondi per frequenza e rappresentano tra il 50 e il 70% di tutti i tumori delle femmine non sterilizzate (Moe, 2001; Salas et al., 2015; Goldschmidt et al., 2017; Sorenmo et al., 2020) e con un tasso di malignità che varia dal 40 al 60% (Zappulli et al., 2019). Come nella donna, si tratta di tumori età dipendenti con un'incidenza maggiore per la cagna tra 8 e 11 anni. Non sembra esistere una predisposizione di razza, ma, allo stesso tempo, è stata evidenziata una predisposizione familiare nel cocker, pastore tedesco, setter, barboncino, bassotto e fox terrier. I tumori mammari sono neoplasie ormono-dipendenti e, a conferma di ciò, l'ovarioisterectomia ha un effetto protettivo se effettuata prima del terzo ciclo estrale. In particolare, l'incidenza di comparsa della neoplasia mammaria si aggira intorno allo 0,05% se la sterilizzazione è effettuata prima del primo calore; questa incidenza aumenta all'8% o al 26% quando gli animali vengono sterilizzati dopo il primo o il secondo calore (Salas et al., 2015). Se l'animale viene sterilizzato dopo i 2,5 anni diminuisce l'effetto protettivo degli ormoni e le cagne svilupperanno tumori ER-abbassando la mediana di sopravvivenza (Sorenmo et al., 2000) Le ghiandole

maggiormente colpite sembrano essere le addominali caudali e le inguinali e questa incidenza trova spiegazione o nella maggiore presenza di tessuto mammario o per una maggiore reattività agli estrogeni. Gli ormoni che agiscono sulla mammella sono diversi e comprendono estrogeni, progesterone, fattore di crescita epidermico, prolattina, insulina e corticosteroidi. È stato ipotizzato che gli estrogeni endogeni, così come i progestinici esogeni, promuovano la cancerogenesi mammaria attraverso un'aumentata produzione dell'ormone della crescita a partire dalle cellule epiteliali della mammella. Tale ormone stimolerà la proliferazione delle cellule mammarie trasformate mediante meccanismi autocrini o paracrini, favorendo lo sviluppo della neoplasia (Marconato et al., 2005). Gli estrogeni, infatti, vengono considerati promotori dell'iniziazione tumorale, determinando il reclutamento di cellule dormienti nel ciclo cellulare e continuando a stimolare il tumore mammario nel tempo, favorendone la progressione.

Tumori mammari nel gatto

Il tumore mammario è la causa più frequente di morte dovuta a neoplasia nei gatti (Jemal et al., 2003) e il terzo più comunemente diagnosticato dopo i linfomi e le neoplasie cutanee (Dorn, 1968); rappresenta il 17% di tutte le neoplasie e fino al 25 % di quelle nei gatti di sesso femminile (Vascellari et al., 2009; Zappulli et al., 2015).

Si verifica prevalentemente nelle gatte di mezza età o più anziane, con un'età media di 10-12 anni (Zappulli et al., 2005; Misdorp et al., 2008).

In questa specie, i tumori mammari sono tra l'85% e il 95% neoplasie maligne (Soremno, 2020), solitamente rappresentate dai carcinomi, la cui incidenza annuale è stata stimata in 25 casi ogni 100.000 gatti in un vecchio report (Dorn, 1968), ma in studi più recenti è stato stimato che l'incidenza è di 230 ogni 100.000 gatti (Egenvall et al., 2010), mentre secondo Chocteau et al., 2019 l'incidenza reale dei carcinomi mammari felini può essere compresa tra 184 e 207 ogni 100.000 gatti, simile ai carcinomi mammari canini. La maggior parte sono carcinomi ormono-indipendenti (80%-90%) di tipo semplice (coinvolgimento di una singola componente cellulare neoplastica: epiteliale luminale) che hanno un comportamento biologico aggressivo (Hayden, 1989; Nielsen, 1967; Misdorp et al., 1999). Le percentuali di metastasi

riportate variano dal 50% al 90% e interessano più frequentemente i polmoni (89%), i linfonodi regionali (83%), le pleure (30%), il fegato (26%) e le ossa (1,5%) (Marconato et al., 2005).

In letteratura, si evince che i gatti di razza Siamese ed i comuni europei sono più predisposti all'insorgenza di tumori mammari. Tra i comuni europei, è stata osservata una maggiore predisposizione in quelli a manto tricolore e l'età media di insorgenza è tra i 10 e i 12 anni, mentre i siamesi tendono a sviluppare neoplasie in età più giovanile rispetto ad altri soggetti (Hayes, 1981). Inoltre, secondo Seixas et al., 2007, i gatti siamesi sviluppano più frequentemente carcinomi mammari micropapillari invasivi (MIMC) e sono la seconda razza più rappresentata (34%) dopo i gatti domestici a pelo corto (60%) per lo sviluppo di carcinomi mammari felini invasivi (FMC) di altri sottotipi.

Si è visto come non c'è differenza nel comportamento biologico dei carcinomi mammari felini (FMT) nelle gatte intere rispetto a quelle sterilizzate (Weijer et al., 1983; Hughes et al., 2012). Uno studio dimostra una riduzione del 91% e dell'86% del rischio di sviluppare FMT nelle gatte sterilizzate prima dei 6 mesi e di 1 anno di età, rispettivamente (Overley et al., 2005). Si osserva, inoltre, un aumento del rischio di sviluppo di tumori mammari nelle gatte femmine (Hayden, 1989; Misdorp, 1991) e nei gatti maschi (Skorupski et al., 2005) sottoposti a trattamento progestinico regolare e prolungato.

L'analisi recettoriale ha evidenziato che il tessuto mammario felino normale contiene sia recettori per gli estrogeni sia per il progesterone, mentre l'espressione di tali recettori nei tumori mammari felini è poco frequente, ad indicare la precoce perdita della dipendenza steroidea durante la progressione maligna. Solo il 10% dei tumori mammari felini esprime recettori per gli estrogeni e questo è correlato alla elevata malignità biologica in questa specie (Marconato et al., 2005).

INFIAMMAZIONE, TUMORE E MICROAMBIENTE STROMALE

Nel 1858 Rudolph Virchow propose la teoria secondo cui le lesioni neoplastiche evolvono nei siti di infiammazione cronica e, quindi, ogni tipo di irritazione meccanica, chimica o termica è fattore essenziale affinché inizi un processo tumorale (Alter, 1925). Questo concetto è stato sempre più analizzato fino ad arrivare alla definizione di Dvorak che associava il cancro ad una ferita che non tende mai alla guarigione (Dvorak, 1986). Con quest'ultima affermazione si comprende come i meccanismi cellulari e biochimici coinvolti nella guarigione delle ferite siano coinvolti anche nella proliferazione di un processo neoplastico. In particolare, la correlazione tra guarigione di una lesione e sviluppo del tumore abbraccia i processi di infiammazione, proliferazione e maturazione che, proprio nell'evoluzione cancerosa, perdono i meccanismi di regolazione e controllo (Byun et al., 2013).

Con la perdita dell'integrità vasale ha inizio un processo infiammatorio che esita inevitabilmente nell'attivazione piastrinica e richiamo in situ di diverse tipologie cellulari comprendenti neutrofili, mastociti, monociti e fibroblasti (McKay, 1972). Anche in un processo neoplastico c'è un risentimento vasale, non per un danno diretto al vaso stesso, bensì per un aumento della permeabilità legato ai livelli del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) secreto dalle cellule tumorali cui consegue un deposito continuo di fibrina e fibronectina e rimaneggiamento tissutale (Folkman, 1971; Dvorak, 2003, Goel et al., 2013, Dvorak, 2021).

Dopo l'infiammazione segue la fase di proliferazione con aumento del nuovo tessuto ed espansione della massa cellulare. Sotto l'influenza del VEGF vengono formati nuovi vasi con riorganizzazione cellulare sia epiteliale che mesenchimale e formazione del tessuto di granulazione. Quindi la proliferazione si accompagna ad una riprogrammazione fenotipica di quasi tutti i componenti cellulari. Questa riprogrammazione è presente anche nel tessuto neoplastico, ma risulta alterata ed esagerata causando una serie di cambiamenti tissutali che esitano nella promozione del tumore stesso (Haddow, 1972; Schäfer et al., 2008).

I monociti, che divengono macrofagi una volta giunti nel sito della lesione, svolgono un ruolo fondamentale sia nell'infiammazione che nel tumore. I macrofagi associati al tumore (TAM) presentano un'elevata plasticità fenotipica altamente dipendente e responsiva al microambiente. Si riconoscono due tipologie fenotipiche note come M1 e M2. I macrofagi M1 si trovano nei processi di guarigione tissutale richiamati dai linfociti T helper 1 (Mantovani et al., 2009; Gordon et al., 2010). Il fenotipo M2 si sviluppa al termine del processo di guarigione guidato dai linfociti T helper 2 (Sica et al., 2008). Questa popolazione macrofagica secreta IL-17, IL-10 e IL-12 e quindi si pensa abbia un ruolo nell'attenuare la risposta immunitaria, ma sembrerebbe essere coinvolta anche nel processo di angiogenesi a seguito della liberazione di VEGF, TGF- β , EGF, prostaglandina E2 e la metalloproteasi di matrice (MMP-9) con conseguente rimodellamento del tessuto sia nelle ferite che nelle neoplasie (Mosser et al., 2008; Schmieder et al., 2012). È proprio questo fenotipo M2 che gioca un ruolo significativo nei processi tumorali, promuovendo l'invasione della neoplasia e le metastasi, tanto da renderne la presenza un fattore prognostico negativo in alcuni tumori, tra cui il tumore al seno della donna (Mukhtar et al., 2011; Medrek et al., 2014; Tiainen et al., 2015; Sousa et al., 2015, Bingle et al., 2002), il carcinoma mammario canino (Seung et al., 2018; Parisi et al., 2021) e sembrerebbe anche il carcinoma mammario felino (Nascimento et al., 2022). Altro ruolo fondamentale è quello rivestito dai fibroblasti che nei processi di guarigione contribuiscono al rimodellamento ambientale. Questa azione viene svolta all'interno del tumore con conseguente persistenza di miofibroblasti che secernono numerose sostanze promuoventi la crescita neoplastica, l'invasione e la metastatizzazione (Otranto et al., 2012).

Quest'ultimo evento peggiora inevitabilmente la prognosi di una neoplasia e affinché avvenga ciò è necessaria una riprogrammazione cellulare con una transizione definita epitelio-mesenchimale. Quanto detto implica che una cellula tumorale debba acquisire la capacità di invadere il tessuto circostante, accedere alla circolazione ematica o linfatica, sopravvivere come cellula singola fino alla meta dove, una volta uscita dalla vascolarizzazione, prolifererà e riacquisirà le caratteristiche epiteliali in modo da colonizzare la nuova sede. La riacquisizione di caratteristiche epiteliali dopo

questo processo è denominata transizione mesenchimo-epiteliale (Valastyan et al., 2011).

La transizione epitelio-mesenchimale è caratterizzata, quindi, da una progressiva evoluzione della cellula epiteliale verso una mesenchimale, con perdita di polarità, aumento della mobilità e resistenza all'apoptosi (Nieto et al., 2012). Ne consegue una perdita di cheratina a favore di filamenti contenenti vimentina, la comparsa di N-caderina sulla superficie della membrana e la secrezione di metalloproteasi capaci di digerire la membrana basale (Klymkowsky et al., 2009).

Esistono tre tipi di transizione epitelio-mesenchimale e in particolare il primo si associa allo sviluppo embrionario, il secondo alla guarigione tissutale e il terzo è tipico dei processi neoplastici che porta ad avere delle cellule con maggiore plasticità (Kalluri et al., 2009).

Da tutto ciò si comprende come il microambiente tumorale sia uno spazio dinamico che, tramite lo scambio di informazioni tra diverse popolazioni cellulari, permette la sopravvivenza e la crescita della neoplasia (Byun et al., 2013).

Tuttavia, la correlazione tra infiammazione e cancro non riguarda soltanto l'origine dei due processi, ma si tratta in realtà di due sistemi strettamente dipendenti dove l'uno favorisce la sussistenza dell'altro.

Chemochine e citochine infiammatorie reclutano leucociti nell'ambiente tumorale e, al tempo stesso, proprio il tumore regola la risposta infiammatoria permettendo un'evasione dal sistema immunitario, che altrimenti riconoscerebbe il tessuto coinvolto come non self, e richiamando in sede cellule infiammatorie che promuovono la crescita della neoplasia (Balkwill et al., 2005; Raposo et al., 2015).

L'infiammazione cronica può evolvere quindi in tumore attraverso la mediazione ad opera di diverse molecole, in particolare NK-kB e IL-6. La prima agisce con un meccanismo antiapoptotico favorendo l'oncogenesi, difatti l'inibizione di NK-kB migliora l'efficacia della chemioterapia (Brien et al., 2007; Nakanishi et al., 2005). Questa molecola è stata particolarmente studiata sia nel tumore alla mammella della donna che della cagna e si è visto come in quest'ultima alti livelli di NK-kB si associano a neoplasie di grandi dimensioni, metastasi linfonodali e scarse probabilità di sopravvivenza (Mkaouar et al., 2012). Anche la IL-6 è coinvolta nei processi di progressione del tumore mammario agendo come modulatore della risposta

immunitaria (Yao et al., 2014). L'azione sinergica di queste due molecole si esplica su diversi tipi cellulari come i TAM, i fibroblasti, alcune cellule T e le cellule neoplastiche (Solinas et al., 2009).

La migrazione di leucociti nei siti tumorali venne dapprima identificata come un meccanismo di difesa dell'organismo che tenta di attaccare il tessuto neoplastico, ma, dall'evidenza della non immunogenicità di alcuni tumori, si comprende come gli infiltrati leucocitari possano, in realtà, avere un ruolo proprio nella progressione del processo piuttosto che nella lotta contro lo stesso (Sica et al., 2006; Zeisberger et al., 2006). A tal proposito basti pensare ai già citati TAM, i quali esplicano un'azione immunosoppressiva e promuovono meccanismi antiapoptotici e processi di angiogenesi. L'attività proinfiammatoria e proangiogenica viene, inoltre, sostenuta da IL-8, secreta dalle cellule tumorali, ma anche mesenchimali e macrofagi (Singh et al., 2013). Nel tumore al seno della donna un aumento di IL-8 è stato associato alla previsione dello sviluppo di metastasi, mentre nel tumore mammario della cagna è un indice prognostico sfavorevole (Benoy et al., 2004; Gelaleti et al., 2012).

In aggiunta, al fine di evadere dalla risposta immunitaria dell'organismo, viene prodotta la IL-10 che ha lo scopo di prevenire la risposta immediata e la presentazione dell'antigene portando ad una tolleranza delle cellule T (Kamradt, 2012). Nelle cagne con carcinoma mammario infiammatorio si sono riscontrati più alti livelli di IL-10 rispetto ad altre neoplasie maligne (De Andres et al., 2013).

TILs & TLS

Una volta sviluppatosi un tessuto neoplastico si ha una serie di mutazioni genetiche risultanti nell'espressione di antigeni tumorali che attivano una risposta immunitaria adattativa antitumorale per eliminare le cellule cancerose. Tipicamente questa risposta immunitaria adattativa si realizza in strutture che prendono il nome di organi linfoidi secondari (SLO) in cui le cellule dendritiche presentano i complessi molecola-peptide alle cellule CD4+T (helper) e CD8+T (citotossici).

Nelle SLO i linfociti B, in seguito alla presentazione dell'antigene, vengono attivati in follicoli primari, poi secondari che infine diverranno centri germinativi. Tutto ciò esita nella proliferazione e differenziazione di linfociti T e cellule B della memoria che

migrano nel tumore e portano alla distruzione delle cellule neoplastiche (Mellman et al., 2011).

Negli ultimi anni, la ricerca oncologica si è concentrata sullo studio del microambiente stromale tumorale e in particolare sulla valutazione dell'infiltrato tumorale linfocitario (TIL). Infatti, è ormai assodato che la risposta immunitaria evocata dal tumore e soprattutto la composizione della stessa abbia valore prognostico in molti tumori solidi, come il tumore al seno della donna. Pertanto, si è visto che nei casi di carcinoma mammario invasivo, la migliore risposta clinica alla chemioterapia neoadiuvante, si riscontra nei tumori con infiltrato linfocitario superiore al 50% rispetto a quelli con scarso infiltrato linfocitario.

Da qui l'importanza della standardizzazione dei TILs, che unitamente alla caratterizzazione tumorale può portare alla scelta di una terapia immunostimolante (Stanton, 2016).

A tal proposito, per la valutazione dei TILs, è stata proposta in Medicina Umana una metodica standardizzata basata sulle linee guida fornite da "Immuno-Oncology Biomarkers Working Group on Breast Cancer", (Salgado et al., 2015). In particolare, il gruppo ha fornito le prime direttive sulla valutazione dei TILs nel tumore al seno della donna, con la possibilità che questa metodica standardizzata possa essere via via adattata ad altri tumori solidi (Hendry et al., 2018).

Secondo le linee guida, la valutazione dei TILs va effettuata in un solo vetrino in ematossilina ed eosina per campione con una sezione di spessore standard (4-5 μm) e, sebbene l'ingrandimento microscopico non incida, si raccomanda un ingrandimento x200-400 (oculare x10, obiettivo x20-x40). Tutte le cellule mononucleate, comprese i linfociti e le plasmacellule vengono conteggiate, mentre sono esclusi i granulociti e gli altri leucociti polimorfonucleati. È importante individuare i limiti del tumore, escludendo le aree esterne e intorno alle aree normali, ma anche le zone con artefatti, necrosi e ialinizzazione. Infine, la valutazione dei TILs dovrebbe essere espressa come un valore percentuale, possibilmente in variabile continua, rispetto al compartimento stromale, quest'ultimo da intendersi come l'effettiva area stromale piuttosto che il totale del numero dei nuclei di cellule stromali (Salgado et al., 2015).

Gli studi iniziali sul tumore al seno hanno portato a valutazioni separate degli infiltrati linfocitari stromali e intratumorali. Salgado et al., 2015 definisce TIL

intratumorali come linfociti nei nidi tumorali che hanno un contatto cellula-cellula senza interposizione di stroma e che interagiscono direttamente con le cellule del carcinoma; mentre i TIL stromali si trovano dispersi nello stroma tra le cellule del carcinoma e non sono a contatto diretto con le cellule carcinomatose. Anche Muscatello et al. 2022, riporta la stessa definizione di TILs stromali, ma nella valutazione delle TILs introduce la distinzione tra *“Invasive front TILs”* che si trovano nell’immediata area peritumorale dello stroma sul fronte invasivo del tumore e *“Peripheral TILs”* che si trovano nello stroma dei lobuli adiacenti.

L’ipotesi originale prevedeva che i linfociti più rilevanti potessero essere quelli che interagiscono direttamente con le cellule tumorali; tuttavia, i TILs stromali sono maggiormente studiati per la valutazione diagnostica in virtù del fatto che sembrano rappresentare un parametro più riproducibile. I TILs intratumorali, infatti, sono generalmente numericamente inferiori e non sempre presenti. Inoltre, la valutazione dell’infiltrato intratumorale non aggiunge informazioni prognostiche essendovi un parallelismo con quello stromale che sembra anche meno influenzato dalla crescita del tumore. Esistono comunque degli studi che stabiliscono come la valutazione di entrambe le categorie possa avere valore predittivo per ciò che concerne la risposta alla chemioterapia (Vinayak et al., 2014; Salgado et al., 2015).

Tipicamente la soglia limite di linfociti stromali è del 50-60% e a tal proposito si colloca l’espressione di cancro al seno a predominanza di linfociti (LPBC) che indica un tumore che contiene più linfociti che carcinoma (Salgado et al., 2015).

La valutazione quantitativa degli infiltrati, associata ad una valutazione di tipo qualitativo attraverso l’immunoistochimica, permette di identificare la composizione dei TILs presi in esame. Da studi effettuati in Medicina Umana, vi è una significativa associazione tra la presenza di specifici sottoinsiemi di cellule immunitarie e la risposta clinica del paziente, evidenziando come punto critico l’immunità adattativa mediata dai linfociti T e B. Nel tumore al seno, la presenza di infiltrati di tipo T CD8+ citotossico è stata associata ad una maggiore sopravvivenza del paziente e a una migliore risposta alla terapia (Ali et al., 2014; Catacchio et al., 2019). Inoltre, i linfociti Th1 sono stati associati a esiti clinici favorevoli, mentre i Th2 all’attenuazione della risposta antitumorale (Osawa et al., 2006; Fridman, et al., 2017). La risposta immunitaria tumorale dipende anche dal sottotipo molecolare del tumore al seno. Infatti, in

medicina umana si riconoscono cinque profili molecolari ovvero Luminale A, Luminale B, HER2 positivo, Triple negative e Basal-Like.

In Medicina Veterinaria, gli infiltrati sono stati attenzionati con particolare riguardo ai linfociti T che in diversi studi sono stati direttamente correlati alla progressione del tumore mammario del cane e ad un grado maggiore di metastatizzazione, ma sempre in stretta correlazione con il rapporto tra CD4+ e CD8+, denunciando una maggiore malignità se predominante il primo gruppo (Carvalho et al., 2014). Invece, nel gatto, vi sono alcuni studi recenti sul microambiente tumorale del carcinoma mammario felino (FMC), nel quale Dagher et al., 2020, hanno riscontrato che l'espressione di cellule T regolatorie (Treg) peritumorali e intratumorali (FOXP3+) è associata a una sopravvivenza libera dalla malattia più lunga e a una sopravvivenza complessiva più breve nelle gatte con carcinomi mammari luminali e triplo-negativi, come riportato nel carcinoma mammario umano. Nella gatta, infatti, l'alto tasso di malignità, la recidiva e la metastatizzazione sono legati ad una maggiore frequenza dei sottotipi molecolari quali l'HER2-positivo e il Triplo- Negativo, ovvero i più aggressivi. Sempre con riferimento ai Treg, una maggiore infiltrazione di quest'ultimi al livello peritumorale è risultata essere correlata a dimensioni maggiori del tumore e a metastasi linfonodali (Dagher et al., 2020).

Un'aumentata intensità di infiltrazione linfocitaria nel microambiente stromale è stata correlata con la produzione di una serie di molecole che inducono il così definito 'checkpoint immunitario' e il 'meccanismo di fuga' delle cellule tumorali dal sistema immunitario. In alcuni studi condotti sulla gatta da Nascimento et al. nel 2021 sono state identificate le molecole prodotte dalla popolazione linfocitaria che caratterizza i TILs coinvolte nel meccanismo dell'immunosoppressione, importante per la progressione tumorale, quali per esempio la siero proteina della morte cellulare programmata (PD-1) e il ligando di morte programmata (PD-L1). I risultati hanno mostrato un punteggio più alto di TILS PD-L1-positivo nei tumori HER2-positivi rispetto a quelli triplo negativo (TN) normali. Inoltre, il punteggio PD-L1 sulle cellule tumorali era significativamente più alto nei tumori HER2-positivi rispetto ai carcinomi mammari TN normali. Per quanto riguarda l'espressione di PD-1 nei TILS e cellule tumorali, non sono state riscontrate differenze significative tra tumori HER2-positivi e carcinomi mammari normali TN (Nascimento e Ferreira 2021).

Da quanto fin qui presentato, si comprende come il FMC sia stato proposto da Nascimento e Ferreira 2021 come modello oncologico affidabile per lo studio del carcinoma mammario umano, in quanto condivide con quest'ultimo caratteristiche cliniche, istopatologiche ed epidemiologiche, nonché le vie coinvolte nell'iniziazione e nella progressione del cancro. Inoltre, a differenza dei modelli di laboratorio di roditori, il gatto è immunocompetente e condivide lo stesso habitat degli esseri umani, riflettendo in modo più accurato la complessa interazione tra genetica e fattori di rischio ambientali (Adega et al., 2016; Urbano et al., 2020).

In Medicina Umana, ruolo ancora discusso è quello delle cellule B e dei NK anche se si riconoscono ad entrambi attività antitumorali e al tempo stesso protumorali, potendo quindi agire da indici prognostici positivi o negativi (Bassani et al., 2019; Largeot et al., 2019). I linfociti B, oltre ad essere coinvolti nella risposta umorale, hanno azioni dirette sulle cellule tumorali con conseguente uccisione delle stesse, inducono una risposta Th1 e la generazione di Tregs, sebbene una sottopopolazione nota come Bregs sembri avere effetto soppressivo (Largeot et al., 2019).

Le cellule NK vengono classificate come cellule linfoidi innate (ILC) e giocano un ruolo chiave nell'immunità antitumorale, potendo uccidere direttamente le cellule tumorali, sebbene alcune sottopopolazioni abbiano un forte effetto angiogenico (Malmberg et al., 2017).

Si comprende, quindi, come valutazione quantitativa e qualitativa degli infiltrati siano intimamente connesse in virtù del valore prognostico e predittivo, proprio per il loro impiego nello stabilire i protocolli terapeutici oncologici. Nella chemioterapia neoadiuvante (NACT), infatti, vengono utilizzati al fine di prevedere quali pazienti avranno risultati migliori a seguito della terapia. L'aumento dei TILs post-NACT è associato ad una prognosi favorevole nei tumori al seno (Denkert et al., 2010). Tuttavia, il ruolo prognostico dell'infiltrato è il risultato del bilancio delle attività antitumorali o soppressive svolte dallo stesso, il quale a sua volta si ricollega alla sua composizione. L'equilibrio della densità di linfociti T citotossici-TIL e Treg-TIL sembra avere un impatto significativo sulle risposte cliniche post-NACT (Asano et al., 2016).

Un altro ruolo prognostico e predittivo nei tumori mammari è dato dalle strutture terziarie linfoidi (TLS) che simulano il comportamento delle SLO, difendendo l'organismo direttamente dal tumore (Dieu-Nosjean et al., 2016) e rappresenterebbero

quindi dei siti per la presentazione degli antigeni tumorali vicini alle cellule dendritiche con conseguente attivazione, proliferazione e differenziazione delle cellule T e B e quindi una risposta immunitaria sia cellulo-mediata che umorale (Martinet et al., 2011; Di Caro et al., 2014; Sautès-Fridman et al., 2019). Quest'ultima altro non sono che il risultato di un'esposizione continua e prolungata di un tessuto ai segnali infiammatori, potendosi sviluppare in diverse condizioni fisiopatologiche come malattie autoimmunitarie, patologie infettive, trapianti di organi, disordini infiammatori e processi neoplastici (Aloisi et al., 2006; Lucchesi et al., 2013; Trüb et al., 2021). Le TLS sono composte da zone ricche di linfociti T con cellule dendritiche giustapposti a follicoli di linfociti B con caratteristici centri germinativi e circondati da plasmacellule. Alcune venule ad endotelio alto, simili a quelle presenti nelle SLO, possono essere evidenziate nelle vicinanze e hanno lo scopo di permettere l'entrata dei linfociti (Martinet et al., 2011). Da studi effettuati in Medicina Umana si evince come le TLS, evidenziate nello stroma, nei margini e nella porzione centrale di differenti tipologie tumorali, sono delle realtà dinamiche a varia organizzazione da semplici ammassi di linfociti fino a strutture più complesse quali appunto le SLO (Colbeck et al., 2017; Engelhard et al., 2018). In realtà, ancora oggi, non esiste un pieno accordo sui componenti cellulari che definiscono un TLS. Tuttavia, è riconosciuto che ci sono tre diversi stadi di maturazione. Il primo stadio è il meno organizzato e consiste in aggregati di linfociti T e B senza la presenza di FDC. I TLS primari simili a follicoli contengono FDC, ma non sono presenti centri germinali. Infine, anche i TLS secondari follicolo-simili completamente maturi presentano centri germinali (Schumacher et al., 2022). La densità delle TLS è correlata a quella delle cellule CD4+ T e CD8+ T presenti nel tumore e l'evidenziazione delle strutture terziarie è stata associata ad una prognosi favorevole per molte neoplasie maligne solide fino ad adesso studiate, a dimostrazione della loro capacità di indurre una risposta antitumorale sistemica duratura (Goc et al., 2014; Trüb et al., 2021).

Riguardo la formazione delle strutture terziarie linfoidi sembrerebbe che quest'ultime impieghino le stesse chemochine e molecole di adesione utilizzate anche dalle strutture secondarie linfoidi per la loro organizzazione. In particolare, la produzione locale di chemochina CXCL13 e IL-7 da parte dei linfociti o cellule stromali recluta un induttore di tessuto linfonodale (LTi) nel sito dell'infiammazione, tuttavia

sia cellule Th17 che B che macrofagi M1 sono in grado di sostituire LTi nel ruolo di iniziatore ai fini dell'organizzazione delle strutture terziarie linfoidi in diversi contesti (Meier et al., 2007). Le cellule LTi interagiscono con le cellule stromali attraverso la linfotossina $LT\alpha 1\beta 2$ che si lega al recettore $LT\beta$, scatenando così il rilascio del fattore c di crescita vascolare endoteliale (VEGFC) con conseguente sviluppo delle venule ad endotelio alto (HEV) (Furtado et al., 2007). Inoltre, le cellule stromali rilasciano alcune molecole di adesione che in combinazione con IL-17 (prodotta da LTi) portano alla liberazione di alcune chemochine inducendo l'espressione di $LT\alpha 1\beta 2$ sui linfociti, reclutati dalle HEV, e organizzando la disposizione delle cellule T e B (Luther et al., 2002).

Le cellule dendritiche (DC) presentano l'antigene alle cellule T CD4+, ma, da quanto si è evidenziato da studi effettuati su metastasi ovariche, le DC sembrerebbero essere coinvolte anche nella presentazione dell'antigene alle cellule B dei centri germinali. Inoltre, l'immunoglobulina G antitumorale prodotta localmente aumenta la capacità di presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche attraverso recettori specifici per le IgG (Montfort et al., 2017). In generale, gli studi hanno dimostrato come le TLS siano capaci di generare una risposta da parte di cellule B effettrici e della memoria producendo anticorpi contro l'antigene tumorale proteggendo dalle metastasi (Sautès- Fridman et al., 2019).

Il collegamento tra TLS e parametri istopatologici è abbastanza discusso e sembra avere risvolti differenti in base alla tipologia di neoplasia presa in considerazione. Ad esempio, nel melanoma la presenza di HEV è correlata a buone caratteristiche cliniche e quindi prognosi favorevole; nel carcinoma squamocellulare orale una maggiore presenza di TLS si rinviene negli stadi T1 e T2; al contrario nel tumore gastrico più è elevato lo stadio maggiore sarà la presenza di TLS e un comportamento analogo ha il carcinoma vescicale muscolo-invasivo (Martinet et al., 2012; Hill et al., 2018; Koti et al., 2018). Per ciò che concerne il tumore al seno della donna, i tumori ad alto grado sono risultati due volte più inclini a mostrare TLS rispetto ai tumori di basso grado (Figenschau et al., 2015).

Nel tumore al seno si è visto come la presenza di TLS infiltrati da cellule tumorali sia associata ad invasione linfatica e coinvolgimento linfonodale nei tumori HER2- (Liu

et al., 2017). Si potrebbe ipotizzare che le cellule tumorali che penetrano le TLS possano metastatizzare più facilmente ai linfonodi regionali (Finkin et al., 2015).

Da quanto sopra enunciato si evince come i TLS siano quindi i siti principali in cui si generano le risposte immunitarie antitumorali e da ciò si può comprendere come sia divenuto importante valutare il loro impatto sulla risposta al trattamento e la loro modulazione da parte delle terapie (Sautès-Fridman et al., 2019). È stata, infatti, considerata la possibilità di sviluppare strategie volte alla neogenesi delle TLS nei tumori per consentire lo sviluppo di linfociti B e T della memoria e garantire una ottimale difesa dal tessuto neoplastico. Le HEV che circondano i TLS permettono ai linfociti l'ingresso nel tumore; pertanto, una strategia terapeutica potrebbe essere mirata a migliorare questa caratteristica (Colbeck et al., 2017).

Guardando con maggiore attenzione all'impatto prognostico delle strutture terziarie nel cancro al seno, la presenza di TLS peritumorali si associa ai tumori di terzo grado ed è stato evidenziato come in pazienti con carcinoma duttale invasivo la prognosi peggiori qualora le strutture terziarie siano presenti (Sofopoulos et al., 2019). La prognosi sfavorevole dipende sia dalla posizione delle TLS che dalla densità. Nei tumori HER2+ si è visto come la presenza di TLS nel margine invasivo e/o peritumorali fosse collegata ad una migliore sopravvivenza libera da malattia, ma una peggiore sopravvivenza complessiva, mentre questa differenza non è rilevata per i tumori HER2- (Liu et al., 2017). Inoltre, Fortis et al. 2017, hanno dimostrato come l'alta densità intratumorale di cellule CD8+ nei margini invasivi e non nel centro del tumore sia correlata ad una prognosi favorevole nei pazienti con tumore al seno. È stato, quindi, ipotizzato che gli elementi del sistema immunitario localizzati nei margini o peritumorali possano riflettere una progressiva migrazione delle cellule maligne dal centro tumorale alle aree esterne e alle metastasi (Liu et al., 2017).

Alcuni studi suggeriscono come le TLS associate all'infiammazione servano come nicchie per le cellule tumorali progenitrici potendo portare, ad esempio, ad una recidiva del carcinoma epatocellulare. Le TLS periferiche possono così contribuire ad un ambiente immunosoppressivo, sostenendo la crescita del tumore attraverso effetti negativi sull'immunità antitumorale o effetti positivi proprio sulla neoplasia (Finkin et al., 2015).

In generale, sembrerebbe dunque che la presenza di TLS sia associata ai sottotipi di tumore al seno più aggressivi come il TNBC (carcinoma mammario triplo negativo), HER- e luminal B, mentre i tumori senza TLS sono tendenzialmente del tipo luminal A (Figenschau et al., 2018).

Da alcuni studi condotti allo scopo di analizzare la rilevanza della componente immunitaria anche nei siti metastatici del tumore al seno, si evidenzia un più alto livello di TILs nelle metastasi polmonari rispetto ad altre sedi. Infatti, essendo il polmone un organo costantemente esposto ad antigeni di differente natura, la risposta precoce allo stimolo tumorale è fondamentale. Sebbene i TILs siano più elevati nelle metastasi polmonari, le TLS invece non differiscono sostanzialmente dalla sede originaria. Inoltre, si sottolinea l'assenza di strutture terziarie linfoidi nelle metastasi al cervello e all'ovaio. Per la prima sede ancora non sono state evidenziate spiegazione univoche, per l'ovaio si presume che possa essere legato alla scarsa immunogenicità dei tumori mammari che metastatizzano a questo livello (Lee et al., 2019).

Quindi complessivamente l'impatto clinico delle TLS nei diversi siti metastatici dei vari tumori è correlato al tipo di tumore, l'organo, il grado di maturazione delle TLS, la loro localizzazione e il contesto infiammatorio (Lee et al., 2019).

Aven

Quando si instaura un danno al DNA, la cellula risponde attivando dei meccanismi che conducono o alla riparazione o alla morte della cellula stessa per apoptosi. È proprio un'alterazione di questo meccanismo che permette alla cellula tumorale di sopravvivere e proliferare.

Si conoscono due vie di trasduzione del segnale di apoptosi. La via estrinseca è innescata dall'attivazione dei recettori della morte (TNF) da parte di una proteina nota come Fas, dal legame dai due ha poi origine una cascata che porta al richiamo di diverse molecole di pro-caspasi 8 che tendono ad attivarsi vicendevolmente dando origine alla caspasi 8 attiva. La via intrinseca prevede il rilascio dai mitocondri di molecole pro-apoptotiche come il citocromo C che lega la proteina Apaf-1 attivando la caspasi-9. Le caspasi attivate generano una cascata con l'attivazione di altri enzimi formando l'apoptosoma (McGavin et al., 2008).

La mancata formazione di quest'ultimo contribuisce allo sviluppo del tumore e alla resistenza alla chemioterapia. Sono diverse le molecole che sono state evidenziate con funzionalità antiapoptotica e una di queste è Aven, la cui azione si esplica attraverso un legame con Apaf-1 interferendo, così, con la formazione dell'apoptosoma (Chau et al., 2000). Si tratta comunque di una molecola ubiquitaria il cui meccanismo è ancora oggi oggetto di studi; tuttavia, si riconosce come il potenziale antiapoptotico di Aven venga regolato dalla catepsina D. Questa molecola risulta sovraespressa in alcuni tumori come quello al seno, con rilascio della stessa nel citoplasma e conseguente attivazione di Aven per mezzo della scissione di una subunità N-terminale, rendendo così le cellule tumorali resistenti all'apoptosi (Garcia et al., 1996; Melzer et al., 2012).

Aven interagisce, oltre che con Apaf-1, anche con Bcl-xL, proteina antiapoptotica che regola la permeabilità della membrana mitocondriale e la cui sovrapproduzione esita in una resistenza alla chemioterapia ed è indice di prognosi sfavorevole per il tumore al seno (Olopade et al., 1997). In uno studio condotto da Kutuk et al. (2010), è stato evidenziato come il danno al DNA esercitato su cellule tumorali mammarie sia correlato ad un'elevata presenza di Aven che inibisce l'apoptosi e stabilizza i livelli di Bcl-xL, proteggendo questa dalla degradazione. Così facendo, Aven blocca a monte la formazione dell'apoptosoma. Dallo studio non sono emerse correlazioni tra grado e classificazione del tumore al seno e sovraespressione di Aven, riconoscendo soltanto un'associazione con l'età in un rapporto di proporzionalità inversa (Kutuk et al., 2010).

Eritropoietina

L'eritropoietina (EPO) è un ormone glicoproteico, la cui produzione è indotta da stimoli ipossici tramite il fattore ipossico inducibile 1 (HIF-1), e rientra nella famiglia delle citochine agendo tramite recettore EPOR (Goldberg et al., 1988). Dal legame tra EPO e EPOR ha origine la proliferazione, differenziazione e sopravvivenza con inibizione dell'apoptosi di cellule progenitrici eritroidi e non solo, poiché oggi se ne riconosce ampiamente un'azione mitogena e antiapoptotica su diverse tipologie cellulari che esprimono il recettore (Ihle et al., 1994; Dawson, 2002). Il complesso EPO/EPOR è stato analizzato nel tumore al seno dimostrandone un coinvolgimento diretto nella vitalità e crescita del tumore tanto da far temere che l'eritropoietina

sintetica, somministrata in casi di anemia, potesse essere direttamente coinvolta nella comparsa della neoplasia (Leyland-Jones, 2003).

Da qui è nato l'interesse nel ricercare l'espressione di EPOR nelle lesioni neoplastiche della ghiandola mammaria del cane che ha portato ai seguenti risultati valutati in immunohistochimica. La positività nella ghiandola mammaria normale era impercettibile, mentre l'immunoreattività si evidenziava sia nelle lesioni preneoplastiche che neoplastiche con un aumento dell'espressione di EPOR man mano che ci si avvicinava ad un modello maligno (Sfacteria et al., 2005).

L'aumento dell'espressione di EPOR sembra avere, quindi, l'obiettivo di garantire la sopravvivenza dei tumori migliorando l'ipossia e perciò plausibilmente la somministrazione esogena di EPO potrebbe promuovere la proliferazione e sopravvivenza tumorale (Goldberg et al., 1998; Sfacteria et al., 2005).

Mastociti e triptasi

I mastociti (MC) svolgono diversi ruoli nell'ospite agendo soprattutto con funzione di sentinella e reclutando cellule effettrici del sistema immunitario innato e adattativo (Galli et al., 2008). All'attivazione, mediata da IgE e altre chemochine, consegue una degranolazione con rilascio di mediatori come l'istamina (Dvorak, 1991).

Nel contesto del microambiente tumorale, molti stimoli possono servire ad attivare i mastociti con conseguenti effetti immunoregolatori sia tumorali, con attività angiogenica, che antitumorali (Oldford et al., 2015).

L'impatto prognostico di questa popolazione cellulare è stato ed è ampiamente dibattuto mancando dati univoci, ad indicare che probabilmente la localizzazione dei MC e il grado di attivazione ne influenzano anche il significato ai fini della prognosi (Groot et al., 2009). Non è nuovo, tuttavia, il concetto secondo cui i mastociti producano sostanze ad effetto antitumorale come l'eparina che nel tumore al seno inibisce la crescita clonogenica, mentre l'istamina può proteggere dall'oncogenesi (Samoszuk et al., 2005; Yang et al., 2011).

L'interesse per i MC trova esplicazione nella loro localizzazione in prossimità dei vasi sanguigni, potendo quindi agire come primi soccorritori (Oldford et al., 2015).

Un aspetto importante è la fuga dal meccanismo immunosoppressivo tumorale mediato anche dalle cellule Tregs. Queste e i mastociti lavorano in modo incrociato poiché le prime possono modulare l'attività dei secondi per inibire la loro degranolazione e l'istamina rilasciata dai MC può inibire l'azione immunosoppressiva dei Tregs, addirittura deviando queste cellule verso un fenotipo pro-infiammatorio (Ganeshan et al., 2012; Piconese et al., 2009).

Per ciò che concerne il valore prognostico attribuito alla presenza di questa popolazione cellulare, sono stati condotti diversi studi riconoscendo comportamenti differenti in diverse tipologie di neoplasie (Dyduch et al., 2012).

In Medicina Veterinaria è stato evidenziato come i MC stromali siano inferiori nei tumori maligni in cui il paziente ha poi sviluppato metastasi. Inoltre, è stata evidenziata una correlazione positiva tra densità stromale di mastociti e tempo di sopravvivenza dei cani con tumori mammari maligni. Tuttavia, nonostante si riconosca che la densità mastocitaria sia collegata al comportamento biologico dei tumori mammari, non è noto se questa possa influenzare direttamente la metastatizzazione o se, invece, sia proprio il tumore a influire sui mastociti e le metastasi (Ariyaratna et al., 2020).

Nel cancro al seno, sebbene la maggior parte dei risultati siano concordi con quanto detto, alcuni studi correlano un'alta densità di MC ad una prognosi sfavorevole e ciò sta ad indicare che queste cellule possono influenzare il comportamento della neoplasia in modo diverso in base alle circostanze (Varricchi et al., 2017).

Un altro aspetto interessante è il coinvolgimento dell'eritropoietina (EPO) che agisce come stimolatore del compartimento emopoietico con induzione di un'espansione degli effettori della risposta immunitaria, come MC e macrofagi (Isogai et al., 2006). Da uno studio condotto da Sfacteria et al. 2011, è stato messo in evidenza come i MC fossero in numero maggiore nelle ghiandole displasiche rispetto alle normali e a quelle neoplastiche e che l'immunoreattività per EPOR era appena rilevabile nei mastociti in carcinomi. Nell'area intratumorale, i MC sono stati scarsamente osservati, mentre un aumento è stato evidenziato nelle aree peritumorali e, inoltre, nessuna area di infiammazione è stata vista vicino ai mastociti suggerendo che la loro presenza non è correlata all'infiltrato infiammatorio tumorale. I mastociti EPOR+ erano numerosi solo nelle lesioni preneoplastiche per poi diminuire significativamente nel tumore. Sulla base di questi dati, sembrerebbe che i MC possano essere coinvolti nella fase di

promozione del tumore attraverso la produzione di sostanze che sostengono la crescita epiteliale (Sfacteria et al., 2011).

L'ipotesi di un effetto pro-tumorale trova adito a seguito del rinvenimento di alti livelli di VEGF prodotto dai mastociti (Sawatsubashi et al., 2000). Questi producono una serina proteinasi specifica, nota come triptasi, strettamente coinvolta nei processi angiogenici e di degradazione della matrice extracellulare. La triptasi mastocitaria influenza la migrazione e la divisione delle cellule endoteliali vascolari e incoraggia la formazione di strutture capillari (Nienartowicz et al., 2006).

Nel tumore mammario della cagna, si è visto come i MC abbiano la tendenza a riunirsi nelle aree periferiche del tumore in stretta associazione con i vasi sanguigni e linfatici e i mastociti positivi alla triptasi sono significativamente numerosi se non addirittura rappresentativi del totale. In aree a maggiore densità di MC, l'angiogenesi risulta aumentata in modo proporzionale proprio ad indicare la potenza angiogenica della triptasi con risultati simili tra tumore mammario della donna e della cagna (Kashiwase et al., 2004; Im et al., 2011). Quanto detto lascia aperta la possibilità di impiegare favorevolmente sostanze antitriptasiche ai fini terapeutici (Im et al., 2011).

Macrofagi

I macrofagi rappresentano una componente importante del microambiente tumorale tanto da parlare di macrofagi associati al tumore (TAM), coinvolti nei meccanismi di rimodellamento dell'architettura tumorale e di angiogenesi, insieme ad effetti immunosoppressivi locali (Bingle et al., 2002).

Alti livelli di TAM sono stati associati ad una maggiore aggressività dei carcinomi mammari canini e a metastasi linfonodali, analogamente a quanto osservato nella donna (Monteiro et al., 2021; Gwak et al., 2015;).

Come già citato nel paragrafo 1.3, i macrofagi vengono distinti in M1 e M2 e quest'ultimi sembrano essere coinvolti nel processo pro-tumorale. Nel cancro al seno è riconosciuto il valore prognostico dei macrofagi e anche nei tumori mammari del cane è stato messo in luce come il grado di infiltrazione macrofagica aumenti nei tumori maligni con un cambiamento anche della polarizzazione a favore del fenotipo M2, soprattutto nel carcinoma solido con aumento della densità microvasale (Hussein et

al., 2006; Monteiro et al., 2018). In recentissimi studi, si è visto come gli M2 localizzati nello stroma, sono stato associati positivamente al FMC scarsamente differenziato, a sostegno del suo ruolo prognostico negativo.

I macrofagi sono chiamati alla produzione di VEGF quando le cellule tumorali smettono di produrlo, soprattutto negli ambienti altamente ipossici, limitando così l'impiego a scopo terapeutico di sostanze anti- VEGF poiché questa molecola continuerebbe ad essere prodotta dai macrofagi prontamente reclutati nel sito tumorale (Crowther et al., 2001; Raposo et al., 2015).

In Medicina Umana, i macrofagi associati al tumore sono stati oggetto di ricerche per scopi terapeutici. In colture di cellule del tumore al seno, un vaccino a DNA a base di legumina si è dimostrato efficace contro i TAM, riducendo il rilascio di fattori proangiogenici e, di conseguenza, la crescita del tumore (Luo et al., 2006).

L'obesità influenza lo sviluppo e la prognosi del cancro al seno e, tra i fattori secreti dagli adipociti, le aromatasi sembrano essere quelle che maggiormente aumentano il rischio di tumore poiché innalzano i livelli circolanti di estrogeni soprattutto in menopausa (Bulun et al., 2012). Anche nei cani è stata riconosciuta una maggiore probabilità di sviluppo di tumore mammario qualora il soggetto si presenti obeso e anche in questo caso vi è una correlazione diretta con i livelli di estrogeni (Sorenmo et al., 2011). Diversi studi hanno riportato che l'infiammazione cronica e il reclutamento di macrofagi sono strettamente correlati con i tumori delle ghiandole mammarie sia in donne obese che in modelli animali. L'obesità abbassa l'età di incidenza del carcinoma mammario nei cani con maggiore probabilità di invasione linfatica. L'obesità è uno stato pro-infiammatorio a tutti gli effetti poiché si associa ad alti livelli di TNF- α e IL-6 (Ghanim et al., 2004) e quindi, avendo già investigato nei precedenti capitoli il rapporto tra infiammazione cronica e carcinogenesi, è facile intuire la diretta correlazione tra stato di nutrizione e tumore. In conclusione, l'infiltrazione macrofagica aumenta nelle aree tumorali dei soggetti obesi ed è statisticamente associata ad un più alto grado istologico (Lim et al., 2015).

Linfociti CD3+

I linfociti T rappresentano il tipo cellulare maggiormente rappresentato nell'infiltrato tumorale e in base al rapporto CD4+/CD8+ si è visto un andamento differente del tumore mammario canino. Infatti, un rapporto maggiore, quindi con abbondanza di linfociti CD4+, si associa a tumori metastatizzanti, mentre il contrario è correlato a neoplasie senza metastasi e con prognosi migliori (Estrela-Lima et al., 2010; Carvalho et al., 2014).

Nei TILs i linfociti CD3+ sono stati ricercati tramite immunoistochimica e valutati all'interno del tumore mammario, alla periferia e nella ghiandola normale, osservando che ad un aumento di queste cellule corrisponde una sopravvivenza complessiva più breve (Carvalho et al., 2011). Nei tumori maligni i linfociti T intratumorali sono maggiori, inoltre il grado di infiltrazione dei carcinomi maligni del cane aumenta man mano che si procede con la malignità e l'invasione linfatica (Saeki et al., 2012). Ad un alto grado istologico tumorale, inoltre, si accompagna una maggiore percentuale di Tregs con azione immunosoppressiva (Kim et al., 2012). Tutto ciò trova stretta correlazione con quanto riportato in Medicina Umana a proposito del tumore al seno, tanto da proporre il cane come modello di studio per la malignità nell'uomo (Carvalho et al., 2014).

Nel tumore al seno, tendenzialmente i linfociti CD8+ sono stati considerati un'efficace risorsa antitumorale, tuttavia questo effetto protettivo è vincolato dall'interazione con le cellule CD4+ che, però, in base alla risposta Th cui sono collegate, possono giocare un ruolo protettivo, nel caso di Th1, o pro-tumorale, Th2 (Gu-Trantien et al., 2013).

La segnalazione tramite c-kit sembra essere coinvolta nel reclutamento dei linfociti T nel sito tumorale e una deregolazione di questa molecola può esitare in un'infiammazione cronica accompagnata da una tolleranza immunitaria (Ray et al., 2010). Rapporti sia nell'uomo che nel cane descrivono i linfociti e la sovraespressione di c-kit nei tumori mammari, sostenendo un ruolo nella progressione tumorale (Chui et al., 1996; Brunetti et al., 2014). In uno studio di Carvalho et al. (2015), le cellule CD3+ sono state associate ad alti livelli di c-kit e produzione di VEGF, suggerendo che anche gli stessi linfociti CD3+ possano essere direttamente correlati con il processo di

angiogenesi. L'aumento di linfociti CD3+ risulta direttamente proporzionale a quello di c-kit e la concomitanza di questi marcatori è stata statisticamente associata ad una maggiore aggressività tumorale e ad una più breve sopravvivenza totale.

È stata ampiamente documentata una certa percentuale di linfociti T CD3+ nella ghiandola mammaria macroscopicamente sana annessa al tumore, con un'associazione statistica con le dimensioni della neoplasia, il grado istologico di malignità, l'invasività e la metastatizzazione. Questo potrebbe sottolineare una diretta correlazione con la progressione del tumore, anche se fenomeni locali indipendenti non possono essere esclusi (Carvalho et al., 2011).

Immunoglobuline e cellule B

I linfociti B che infiltrano il tumore possono avere allo stesso tempo effetti pro- e antitumorali, possono concentrarsi ai margini del tumore o formare degli aggregati con crescente organizzazione fino ad arrivare alle TLS (Pitzalis et al., 2014). Importanti risultano essere soprattutto le interazioni tra queste cellule e i linfociti T poiché si è visto che cellule B CD20+ vicine a cellule T CD8+ nel cancro al seno rappresentano un fattore prognostico positivo e questa cooperazione potrebbe essere spiegata dalla capacità dei linfociti B di presentare l'antigene ai T (Coronella et al., 2002).

La valutazione isolata sul ruolo prognostico delle cellule B porta a risultati differenti in base al tumore e in merito al cancro al seno le informazioni sono contraddittorie. Si riconosce l'esistenza di immunoglobuline che hanno come bersaglio antigenico il tumore, ma queste possono essere prodotte da plasmacellule che risiedono nel midollo osseo e nella milza oppure nel microambiente tumorale stesso (Iglesia et al., 2014; Sharonov et al., 2020). Dall'altro lato, ai linfociti B si riconoscono al contempo effetti protumorali tanto da associare alti tassi di infiltrazione di plasmacellule ad una più breve sopravvivenza nei pazienti con carcinoma mammario invasivo (Mohammed et al., 2013). Inoltre, la persistenza di immunocomplessi, formati da anticorpo e antigene della cellula tumorale, esita nella persistenza di un processo infiammatorio che comporta un ulteriore rimodellamento del microambiente (Barbera-Guillem et al., 1999).

La tipologia di immunoglobulina prodotta nel tumore al seno sembra essere correlata al sottotipo molecolare, avendo nei tumori HER+ un aumento di cellule B e IgG trattandosi di tipologie altamente infiltrate e denunciando quindi una stretta correlazione di questi linfociti con le altre popolazioni cellulari infiammatorie (Iglesia et al., 2014). Tuttavia, sebbene fino a qualche tempo fa le immunoglobuline siano state considerate prodotti esclusivi delle cellule B, oggi è stato dimostrato come altre tipologie cellulari possano produrle e tra queste rientrano i podociti, i gameti, i neuroni e le cellule endoteliali (Jing et al., 2018; Huang et al., 2009; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2011).

Un ruolo particolare è stato riconosciuto alle IgG e dallo studio del comportamento delle stesse si è visto come la loro espressione sia collegata ai mastociti i quali generalmente legano le IgE, ma, qualora gli anticorpi IgG fossero numericamente superiori, questi spiazzano le IgE legandosi ai mastociti ed impedendone la degranolazione. Ciò implica che i mastociti possono essere reclutati e direttamente influenzati positivamente o negativamente dalla modulazione degli anticorpi (Daëron et al., 2016).

In uno studio abbiamo dimostrato come le Ig siano anche un prodotto delle cellule epiteliali della ghiandola mammaria neoplastica del cane e dell'epitelio normale vicino alla neoplasia (Sfacteria et al., 2021).

Una correlazione tra l'espressione delle IgG e i sottotipi istologici del carcinoma ha mostrato che le cellule di cancro al seno scarsamente differenziate esprimono più IgG di quelle ben differenziate (Yang et al., 2013). Tutto ciò proverebbe proprio il coinvolgimento dell'immunità umorale nella progressione del tumore.

IMMUNOTERAPIA

L'immunoterapia è uno dei principali trattamenti emergenti per il cancro al seno della donna (BC), mentre per il tumore mammario canino (CMT) vi sono ancora pochissimi studi in merito e la mastectomia è il trattamento elettivo sebbene sia sconsigliata per il tumore metastatico avanzato (stadio V) (Chang, 2005; Marconato, 2008) e il tumore mammario infiammatorio (IMC) (Peña et al., 2003; Clemente et al., 2009; Marconato et al., 2009). La terapia adiuvante post chirurgia, per ridurre il rischio di sviluppare ulteriori recidive e metastasi, può includere la chemioterapia, la radioterapia e la terapia mirata o individualizzata, quest'ultima basata sulle specifiche caratteristiche genetiche del tumore in un paziente (Haga et al., 2001, Enginler et al., 2014, Kaszak et al., 2018, Thumser-Henner et al., 2020).

Negli ultimi anni, in medicina umana, i trattamenti innovativi per il tumore mammario si sono incredibilmente evoluti, ponendo l'accento su terapie individuali più dirette dal punto di vista molecolare e diminuendo la radio e la chemioterapia per ridurre gli effetti avversi del trattamento (Harbeck et al., 2019).

I biomarcatori predittivi di immunoterapia, come il carico mutazionale del tumore e i linfociti infiltranti il tumore, sono promettenti per classificare le pazienti con BC e ottimizzare l'effetto terapeutico (Li et al., 2021). Infatti, come già accennato i TILs hanno un certo valore prognostico nell'ambito del tumore al seno della donna: infatti, si è visto che nei casi di carcinoma mammario invasivo, la migliore risposta clinica alla chemioterapia neoadiuvante, si riscontra nei tumori con infiltrato linfocitario superiore al 50% rispetto a quelli con scarso infiltrato linfocitario. Uno studio su 256 tumori Triple Negative ha dimostrato che ogni aumento del 10% di TILs è correlato ad una riduzione del 17% del rischio di recidiva, una riduzione del rischio di morte del 27% ed un aumento dell'aspettativa di vita del 18%. Questo suggerisce che a parte il valore predittivo, un incremento dei TILs farmacologicamente indotto possa essere impiegato nella lotta al tumore mammario. Infatti, l'ambiente immunitario in una fase precedente l'inizio della chemioterapia può essere considerato non solo un biomarker

prognostico ma può ugualmente orientare il clinico nella scelta terapeutica. Da qui l'importanza della standardizzazione dei TILs, che unitamente alla caratterizzazione tumorale, possono portare alla scelta di una terapia efficace.

Capitolo 2

TUMORI DELLA GHIANDOLA MAMMARIA DEL GATTO

Classificazione istologica

I tumori mammari felini sono molto meno eterogenei rispetto a quelli canini, in quanto la proliferazione mioepiteliale neoplastica si trova raramente. La maggior parte dei tumori mammari felini (85% - 95%) è maligna (Soremno et al., 2020).

In accordo con la classificazione proposta da Zappulli et al. 2019, tra le lesioni preneoplastiche si annovera la *fibroadenomatosi felina*, che rientra nelle lesioni iperplastiche/displastiche. Questa alterazione è associata alla presenza di progesterone esogeno o endogeno e possono essere coinvolte una o più ghiandole mammarie. Da un punto di vista citologico, si possono notare clusters di cellule epiteliali uniformi con un rapporto N:C elevato e cellule mesenchimali stellate aggregate con moderata anisocitosi e anisocariosi, nuclei ovoidali e una matrice eosinofila. Da un punto di vista istologico, lo stroma appare edematoso o mixomatoso e manifesta bassi tassi di fibrosi o ne è privo. I nuclei dei fibroblasti e delle cellule epiteliali luminali appaiono pleomorfi con varie mitosi. Nei gatti anziani, soprattutto nei gatti maschi, questa lesione displastica può progredire in carcinoma.

Tra le neoplasie epiteliali benigne nel gatto si riscontra l'*adenoma semplice* definito come una lesione non infiltrativa di cellule epiteliali luminali con una conformazione tubulare. È un tumore nodulare, ben demarcato e i lumi dei tubuli contengono secrezioni. Occasionalmente piccole papille possono proiettarsi nei lumi tubulari. I tubuli sono circoscritti da una doppia linea di cellule epiteliali cuboidali o colonnari luminali con una quantità moderata di citoplasma. I nuclei delle cellule epiteliali sono centrali e da tonde ad ovali con cromatina finemente puntinata e un nucleolo piccolo e centrale. Anisocariosi e anisocitosi sono minimi.

I tumori benigni non semplici venivano descritti come complesso dell'adenoma felino ma nella classificazione WHO sono stati riclassificati come adenoma duttale.

Presentano cellule soprabasali e cellule interstiziali mioepiteliali da rotonde ad ovali e cellule mioepiteliali interstiziali non fusiformi e stellate separate da una matrice mixoide. Queste cellule caratterizzano il complesso dell'adenoma, mioepitelioma e tumore misto benigno nel cane. In passato questi aspetti rientravano nella diagnosi di fibroadenoma, oggi dovrebbero rientrare nella diagnosi di cambiamento fibroadenomatoso focale.

L'adenoma duttale è il tumore benigno mammario più comune nella gatta. Una singola mammella o più mammelle possono essere coinvolte. Istologicamente, si evidenziano cellule epiteliali luminali a doppio strato CK8+/18+ e cellule soprabasali da rotonde ad ovali o cellule interstiziali mioepiteliali da rotonde ad ovali che esprimono tutti i markers mioepiteliali (CK5, CK6, CK14, calponina) e positive alla vimentina. Le cellule luminali sono da cuboidali a poligonali con un margine cellulare relativamente indistinto e scarso citoplasma. I nuclei sono da rotondi ad ovali, centrali o basali e occasionalmente ipercromatici con un nucleolo prominente e un rapporto N:C alto. Anisocariosi e anisocitosi sono minimi con poche mitosi.

L'adenoma papillare intraduttale anche se relativamente poco comune è il secondo tumore benigno più frequente. Questa neoplasia consiste in una crescita intraduttale, papillare, arborescente supportata da un asse fibrovascolare. I dotti contenenti le papille neoplastiche possono distendersi. I dotti adiacenti sono spesso ectasici e delineati da cellule epiteliali. Tuttavia, nella specie felina le neoplasie maligne sono statisticamente più frequenti, tra queste il carcinoma semplice è alquanto comune nel gatto. In questo tumore, le cellule epiteliali pleomorfe sono arrangiate in fasci tubulari e questo è il pattern tubulare che tuttavia può coesistere con altri pattern (solido o papillare). I nuclei possono essere ipocromici, normocromici o ipercromici, i nucleoli possono essere singoli e molto grandi o multipli e piccoli. Le cellule spesso hanno una quantità moderata di citoplasma e i margini cellulari sono relativamente distinti. Quando la conta mitotica che normalmente è uguale o superiore a 6 in 2,37 mm² risulta molto alta ovvero superiore a 30 per 2,37 mm² il tumore viene classificato di III grado. Spesso sono presenti aree di necrosi, lo stroma che circonda il tumore può essere variabile ma in alcuni casi può essere sclerotico. Dove le cellule neoplastiche infiltrano la ghiandola mammaria possono evocare una risposta desmoplastica o scirrosa con una estesa proliferazione di miofibroblasti. Ciò che distingue il carcinoma

semplice tubulare da un adenoma semplice è il pleomorfismo nucleare, una conta mitotica aumentata (superiore a 6 mitosi per campo) la presenza di necrosi e la natura infiltrativa della neoplasia.

Il *carcinoma tubulo papillare* è anch'esso molto comune nel gatto. In questa neoplasia più del 20% dei tubuli hanno papille protrudenti nei lumi e questi due pattern sono predominanti. Le papille sono supportate da uno stroma connettivale fibrovascolare. È un tumore spesso aggressivo infiltrante che può metastatizzare soprattutto l'istotipo di 3° grado. Anche il *carcinoma solido* è un tumore maligno comune nel gatto. In questo tumore le cellule epiteliali sono arrangiate in nidi o isole senza lume (crescita solida). Le cellule sono impacchettate poligonali e spesso con margini cellulari poco demarcati con scarso citoplasma. I nuclei sono tondi o ovali e spesso ipercromici con cromatina densa e un singolo centrale e prominente nucleolo. Anisocariosi e anisocitosi sono da moderate a gravi e il numero di mitosi è variabile.

Il *carcinoma micro-papillare invasivo* è invece poco comune nel gatto. All'esame istologico le cellule neoplastiche formano piccoli e irregolari aggregati e papille che non hanno un supporto fibrovascolare e sono circondate da spazi lacunari vuoti. Le cellule sono pleomorfe cuboidali e poligonali e hanno una quantità variabile di citoplasma. I nuclei sono centrali o eccentrici con un grande e centrale nucleolo e una cromatina granulare e scura. Anisocariosi e anisocitosi sono da moderate a gravi, con mitosi variabili. Questo tumore ha un alto potenziale metastatico.

Il *comedocarcinoma* è caratterizzato da un pattern multi-nodulare anche nei tumori singoli. Nei noduli tumorali si riscontrano aree ben definite centrali circolari di necrosi circondate da cellule epiteliali neoplastiche. La necrosi è un accumulo di materiale amorfo eosinofilo misto a resti carioretici cellulari derivanti anche da apoptosi. La conta mitotica è elevata. L'infiltrato è interno ai vasi linfatici nelle aree periferiche della neoplasia, nelle aree metastatiche e nei linfonodi regionali è frequente.

Il *carcinoma anaplastico* è un tumore poco comune, è l'istotipo più maligno che invade il tessuto circostante normale o il tessuto mammario iperplastico displasico e perighiandolare. Le cellule epiteliali neoplastiche sono pleomorfe e organizzate in gruppi di cellule individuali o piccoli gruppi. Poiché questo pattern è stato associato ad un alto grado di malignità anche se presente in una piccola porzione della neoplasia

esso deve essere incluso nella diagnosi. Le cellule epiteliali del carcinoma anaplastico sono grandi tonde ovali o poligonali con moderato o abbondante citoplasma. I nuclei sono grandi tondi o ovali con presenza di uno o più nucleoli di dimensioni variabili. Sono presenti gravi anisocitosi e anisocariosi e nuclei bizzari cariomegalici. Si possono inoltre notare cellule neoplastiche giganti e mitosi atipiche o cellule multinucleate e un abbondante stroma. Le cellule epiteliali invadenti spesso evocano una risposta desmoplastica o scirroso con abbondanti miofibroblasti. Lo stroma può essere infiltrato di linfociti, plasmacellule, mastociti, occasionalmente neutrofilo o eosinofilo e macrofagi. Il carcinoma anaplastico è spesso ricorrente e metastatico.

Il *carcinoma duttale* è stato descritto nel gatto e l'aspetto istologico pare simile al cane. In letteratura quelle neoplasie descritte come carcinoma felino complesso sono carcinomi duttali. Nei carcinomi felini duttali ci sono cellule mioepiteliali interstiziali da tonde a ovali senza matrice mentre, nel carcinoma complesso ci sono cellule interstiziali mioepiteliali fusiformi e stellate con poca matrice o assente. Le cellule epiteliali luminali sono da cuboidali a poligonali con scarso citoplasma, nuclei ipercromici e un rapporto N:C elevato. Essi possono apparire molto simili alle cellule mioepiteliali. La parete dei dotti, ai quali il tumore aderisce, potrebbe in alcuni casi essere ancora visibile, ma il tumore può anche aderire completamente ai lumi dei dotti. Purtroppo, di questa neoplasia non esistono abbastanza dati riguardanti il follow up.

Il *carcinoma papillare intraduttale* è raramente descritto nei gatti e ha caratteri simili a quello canino. È la variante maligna dell'adenoma papillare intraduttale composto da proiezioni papillari che si estendono nel lume di uno o più dotti. Le papille sono supportate da uno stroma fibrovascolare. Occasionalmente si possono osservare formazioni tubulari e meno frequentemente un pattern solido. Le papille hanno una superficie pluristratificata in primis composta da cellule luminali epiteliali e da cellule mioepiteliali soprabasali. Le cellule epiteliali luminali hanno caratteri di malignità con un rapporto N:C elevato, grandi nuclei pleomorfismo cellulare e un aumentato numero di mitosi se comparato all'adenoma intraduttale papillare. Alcune cellule possono presentare una differenziazione squamosa. Le cellule mioepiteliali esibiscono minima atipia.

Tra le neoplasie epiteliali maligne a carattere speciale descriviamo il *carcinoma squamo cellulare*, che risulta alquanto raro nella gatta. È composto principalmente da

epitelio maligno squamo cellulare che origina dalle cellule squamose del capezzolo o dalle cellule epiteliali duttali che hanno subito una differenziazione squamosa e neoplastica. Si possono osservare isole o cordoni di cellule neoplastiche o perle cornee. Cellule e nuclei sono grandi, con una grande quantità di citoplasma e ponti intercellulari. Frequentemente è caratterizzata da un infiltrato infiammatorio secondario con numerosi neutrofili e una reazione scirrosa. Il carattere di tale tumore è simile al carcinoma squamo cellulare con possibilità di metastatizzazione ai linfonodi regionali.

Altri due tumori alquanto particolari sono il *carcinoma adenosquamoso* caratterizzato da aree di differenziamento ghiandolare usualmente tubuli e/o papille e aree di carcinoma squamo cellulare, e il *carcinoma mucinoso* che è un tumore raro caratterizzato da una abbondante produzione di mucina prodotta dalle cellule epiteliali neoplastiche luminali senza proliferazione mioepiteliale (Zappulli et al., 2019).

Grading istologico

Il primo sistema di grading si basa sul metodo ideato da Elston et al., 1991 e Castagnaro et al., 1998 in cui si tengono in considerazione alcuni caratteri istologici ai quali si assegna un punteggio, dalla cui somma si ricavano I, II e III grado. I caratteri considerati sono le formazioni di tubuli, il pleomorfismo cellulare e la conta mitotica (Tabella 1).

Un metodo ancora più recente è stato ideato da Mills et al., 2015 e si tiene in considerazione l'invasione linfovaskolare, la forma del nucleo e la conta mitotica. Anche in questo caso, per ogni carattere si assegna un punteggio di cui la somma ottenuta definisce il I, II e III grado (Tabella 2).

Con il primo metodo di grading al grado I corrisponde un'aspettativa media di vita di 36 mesi, al II grado di 18 mesi e al III di 6 mesi; con il secondo metodo, al I grado corrisponde un'aspettativa di vita media di 31 mesi, al II grado di 14 mesi e al III grado di 8 mesi (Zappulli et al., 2019). L'attività mitotica è una componente comune nella valutazione dei tumori negli animali e nell'uomo. Le neoplasie aggressive hanno un alto tasso di proliferazione, e questo si riflette in un alto numero di figure mitotiche nelle sezioni istologiche; ovviamente ci sono delle eccezioni (es. istiocitoma cutaneo).

| CARATTERISTICHE | | | PUNTEGGIO |
|---|--|---|---------------|
| A. Formazione tubuli | | | |
| I tubuli comprendono >75% del tumore | | | 1 |
| I tubuli comprendono tra il 10-75% del tumore (formazione moderata di disposizioni tubolari mescolate con aree di pattern non tubolari) | | | 2 |
| I tubuli comprendono <10% del tumore (formazioni tubolari minime o assenti) | | | 3 |
| B. Pleomorfismo cellulare | | | |
| Nuclei uniformi, regolari, piccoli con occasionali piccoli nucleoli | | | 1 |
| Moderato grado di variazione della dimensione e della forma del nucleo, nucleo ipercromatico, presenza di nucleoli (alcuni dei quali possono essere prominenti) | | | 2 |
| Marcata variazione nella dimensione nucleare, nucleo ipercromatico, spesso con schiarimento della paracromatina e uno o più nucleoli prominenti | | | 3 |
| C. Conta mitotica (mitosi per 10 HPF) | | | |
| <i>Castagnaro et al. 1998</i> 0,51 mm (0.204 mm ²) 0-7 8-14 >14 | <i>Standard field of view</i> 0,55mm (0.237 mm ²) 0-8 9-17 >17 | <i>Elston and Ellis, 1991</i> 0.59 mm (0.274) 0-9 10-19 >19 | 1 2 3 |
| Grado Istologico (Punteggio totale A+B+C) | | | Totale |
| I (basso, ben differenziato). | | | 3-5 |
| II (intermedio, moderatamente differenziato) | | | 6-7 |
| III (elevato, poco differenziato) | | | 8-9 |

Tabella 1. Criteri di grading istologico dei tumori mammari felini secondo Elston CW, Ellis IO (1991), Castagnaro M et al. (1998).

| CARATTERISTICHE | PUNTEGGIO |
|--|---------------|
| A. Invasione linfovaskolare | |
| Assente | 0 |
| Presente | 1 |
| B. Forma del nucleo | |
| ≤5% Anormali | 0 |
| >5% Anormali | 1 |
| C. Conta mitotica (mitosi per 10 HPF) | |
| ≤62 | 0 |
| >62 | 1 |
| Grado Istologico (Punteggio totale A+B+C) | Totale |
| I (basso) | 0 |
| II (intermedio) | 1 |
| III (elevato) | 2-3 |

Tabella 2. Criteri di grading secondo Mills SW et al., (2015).

La maggior parte degli studi in oncologia veterinaria riporta l'indice mitotico (definito come il numero di cellule che subiscono la mitosi diviso per il numero di cellule che non subiscono la mitosi) quando si contano le figure mitotiche, ma l'IM è definito in modo impreciso e a volte errato. Questo può essere determinato in sezioni istologiche o sospensioni cellulari ed è riportato come percentuale o mitosi per 1000 cellule neoplastiche. Contando il numero di figure mitotiche in 10 campi consecutivi ad alta potenza (hpf) generalmente a 40x, si ottiene invece un conteggio mitotico (MC) ma l'area contata è raramente definita e il termine spesso riportato è 'indice mitotico'. Pare quindi evidente la necessità di standardizzare le dimensioni dell'area di conteggio e definirne le caratteristiche istologiche. Il conteggio mitotico (MC) dovrebbe riflettere le aree più densamente cellulari della neoplasia e non includere aree povere di cellule con necrosi, emorragia, cisti, edema, artefatti o fibrosi. Se un campo ha una quantità considerevole di una di queste caratteristiche, è necessario passare a un altro campo. Si valutano le aree vicino alla periferia del tumore poiché queste dovrebbe essere più proliferative e invasive.

La MC è facile, rapida ed economica da determinare per i patologi diagnostici e ha dimostrato avere un valore clinico predittivo; tuttavia, tutti gli indici proliferativi sono solo stime della proliferazione in vivo, fattore da tenere in considerazione quando il valore ottenuto si avvicina al valore soglia anche definito 'cut-off' (Meuten et al., 2016). Alcuni autori (Preziosi et al. 2002), hanno, inoltre, ideato un sistema basato su 3 stadi istologici:

- stadio 0 - Carcinoma in situ,
- stadio 1 - Carcinoma invasivo senza metastasi nodali o invasione linfovascolare,
- stadio 2 - Carcinoma invasivo con metastasi linfonodali o invasione linfovascolare.

I carcinomi mammari in situ sono definiti come tumori epiteliali maligni che 'non si sono estesi oltre la membrana basale nel tessuto circostante il tessuto mammario'. Nella specie felina, la frequenza di questo tipo è stata stimata tra 1,6 e 18,8% dei carcinomi mammari (Marconato et al., 2005).

NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO NELLA FAC DEL GATTO

Il cambiamento fibroadenomatoso del gatto (feline fibroadenomatous change - FAC) della ghiandola mammaria nel gatto, indicata anche come iperplasia fibroadenomatosa mammaria o, iperplasia/ipertrofia/complesso fibroadenomatoso o ipertrofia mammaria fibroepiteliale, è caratterizzata da proliferazioni benigne dello stroma e dell'epitelio ghiandolare, sotto dipendenza progestinica. È considerata una delle lesioni non maligne più comuni della ghiandola mammaria felina e può verificarsi in gatte al momento della pubertà, durante la gravidanza o la pseudogravidanza, o in gatti, femmine e maschi di qualsiasi età, sotto trattamento progestinico (Allen, 1973; Zappulli et al., 2019). In base alla più recente classificazione internazionale pubblicata dalla David Thompson Foundation (Zappulli et al., 2019), la FAC rientra tra le lesioni iperplastiche/displastiche.

Nel cambiamento fibroadenomatoso, il progesterone guida lo sviluppo e la crescita della ghiandola mammaria attraverso il recettore del progesterone sulle cellule stromali ed epiteliali (Martín De Las Mulas et al., 2000). Probabilmente sono coinvolti altri fattori di crescita locali, anche se il progesterone è il principale induttore della FAC (Mol et al., 1996). Sono stati descritti due pattern ecografici e macroscopici: il tipo solido con scarso accumulo di liquido e il tipo parenchimale intraduttale con spazi pieni di liquido (Hayden et al., 1989; Payan-Carreira, 2013). I due pattern possono essere combinati nella stessa lesione o uno dei due può essere predominante. La ghiandola mammaria colpita mostra un rapido aumento di dimensioni diffuso, simmetrico o asimmetrico, che va da 1,5 a 18 cm (Payan-Carreira, 2013). Nei casi più gravi, alcune pazienti presentano aree eritematose e necrotiche sulla pelle, con sintomi sistemici quali anemia, febbre, tachicardia, apatia e anoressia (Loretti et al., 2004). A causa della gravità della malattia, in passato sono stati utilizzati trattamenti non conservativi come l'ovariectomia, per rimuovere la fonte di progesterone, associata o meno a una mastectomia totale o parziale per rimuovere le ghiandole mammarie danneggiate. L'asportazione delle ovaie, di solito, porta alla regressione del tessuto

mammario entro 21- 24 giorni (Payan-Carreira, 2013), ma in alcuni casi la regressione non viene raggiunta (Görlinger et al., 2002; de Melo et al., 2020). La mastectomia è una procedura difficile da eseguire nelle gatte affette da FAC, a causa dell'estensione delle ghiandole mammarie e dello scarso tasso di sopravvivenza; è l'ultima opzione terapeutica da considerare nelle lesioni non responsive o quando la ghiandola mammaria presenta estese alterazioni necrotiche (Payan-Carreira, 2013). L'aglepristone è considerato il farmaco elettivo per il trattamento della FAC (Wehrend et al., 2001; Görlinger et al., 2002; Vitasek et al., 2006; de Melo et al., 2020), riducendo ma non annullando il numero di gatti che necessitano di una mastectomia. Non esistono, invece, programmi terapeutici per il trattamento della FAC nelle gatte femmine gravide senza compromettere la fertilità, la lattazione e le cucciolate. Lo scopo del presente studio è quello di riportare una serie di casi di quattro gatte femmine non gravide e quattro gravide con FAC trattate in modo conservativo con una combinazione di farmaci e nutraceutici.

Materiali e metodi

Otto gatte femmine intatte sono state portate in clinica in quanto presentavano la FAC tra il 2015 e il 2020. L'età, al momento del ricovero, variava da 8 a 12 mesi (Tabella 3). Quattro gatti erano gatti domestici a pelo corto (C1, C2, C5 e C8), due gatti erano Maine Coon (C3 e C6) e due gatti erano Persiani (C4 e C7). Nessuna delle gatte era stata trattata con progestinici esogeni, ma aveva un'anamnesi di recenti calori. Quattro gatte (C5, C6, C7 e C8) al momento della presentazione erano tra il 25° e il 32° giorno di gravidanza.

| Casi | Segnalamento | Segni clinici | Trattamento | Follow-up |
|------|--------------|--|---|--|
| C1 | GD, 1 anno | Ingrossamento simmetrico delle GM con cute arrossata, dolente e ulcerata. Tachicardia, letargia e anoressia. | Aglepristone, antibiotici, antinfiammatori, oltre a maltodestrine e bromelina, iperico e neem e aloe. | Dopo 2 settimane, riduzione delle GM, nessuna infiammazione; dopo 4 settimane, remissione completa. |
| C2 | GD, 1 anno | Ingrossamento simmetrico delle GM con cute arrossata, dolente e ulcerata. Tachicardia, letargia e anoressia. | Aglepristone, antibiotici, antinfiammatori, oltre a maltodestrine e bromelina e aloe. | Dopo 3 settimane, riduzione delle GM, assenza di infiammazione, ulcere e necrosi; dopo 5 settimane, remissione completa. |
| C3 | MC, 8 mesi | Ingrossamento simmetrico delle GM con cute arrossata, dolente e | Aglepristone, antibiotici, antinfiammatori, oltre a | Dopo 3 settimane, riduzione delle GM, assenza di infiammazione, ulcere e |

| | | | | |
|----|------------|--|---|--|
| | | ulcerata. Tachicardia, letargia e anoressia. | maltodestrine e bromelina, iperico e neem e aloe. | necrosi; dopo 5 settimane, remissione completa. |
| C4 | P, 9 mesi | Ingrossamento simmetrico delle GM | Aglepristone, oltre a maltodestrina e bromelina e aloe. | Dopo 2 settimane, riduzione delle GM; dopo 4 settimane, remissione completa. |
| C5 | GD, 1 anno | Ingrossamento simmetrico delle GM con cute arrossata, dolente e ulcerata. Tachicardia, letargia e anoressia, 28° giorno di gravidanza. | Aglepristone, antibiotici, antinfiammatori, oltre a maltodestrine e bromelina, iperico e neem e aloe. | Perdite vaginali sanguinolente per 1 settimana; dopo 3 settimane, riduzione delle GM, assenza di infiammazione, ulcere e necrosi; dopo 5 settimane, remissione completa. |
| C6 | MC, 1 anno | Ingrossamento simmetrico delle GM, 25° giorno di gravidanza, segni di riassorbimento fetale. | Aglepristone, oltre a maltodestrina e bromelina e aloe. | Perdite vaginali sanguinolente per 1 settimana, placenta ritenuta trattata con Cloprostenolo; dopo 2 settimane, riduzione delle GM; dopo 4 settimane, remissione completa. |
| C7 | P, 9 mesi | Ingrossamento simmetrico delle GM con cute arrossata e dolente. Tachicardia, letargia e anoressia, 30° giorno di gravidanza. | Antibiotici, antinfiammatori, oltre a maltodestrine e bromelina e aloe. | Dopo 3 settimane, riduzione delle GM, assenza di infiammazione, ulcere e necrosi; dopo 5 settimane, remissione completa; parto a termine di 4 gattini, allattati e svezzati. |
| C8 | GD, 1 anno | Ingrossamento simmetrico delle GM con cute dolente e ulcerata. Letargia e anoressia, 32° giorno di gravidanza. | Aglepristone, antibiotici, antinfiammatori, oltre a maltodestrine e bromelina, iperico e neem e aloe. | Dopo 3 settimane, riduzione delle GM, assenza di infiammazione, ulcere e necrosi; dopo 4 settimane, remissione completa; parto a termine di 5 gattini, allattati e svezzati. |

Tabella 3. Sintesi dei risultati clinici della serie di casi. GD: Gatti domestici a pelo corto; MC: Main Coon; P: Persiani, GM: Ghiandole mammarie.

Le ghiandole mammarie si presentavano ingrossate bilateralmente senza secrezione di latte. In sei casi (C1, C2, C3, C5, C7 e C8) erano presenti ulcerazioni cutanee, ghiandole mammarie infiammate e dolenti.

I segni generali (tachicardia, letargia e anoressia) erano fortemente correlati a queste alterazioni.

Una volta eseguita la diagnosi di FAC, basata sui sintomi clinici, è stato effettuato, a supporto della diagnosi clinica, un esame citologico tramite biopsia con ago sottile del tessuto mammario che ha rilevato tessuto ghiandolare-epiteliale e cellule mesenchimali e l'assenza di cellule infiammatorie. Gli strisci citologici hanno permesso di escludere una crescita maligna o una mastite. L'esame ecografico della ghiandola mammaria e il doppler sono stati utilizzati per valutare la struttura e la vascolarizzazione della lesione. La FAC si presentava principalmente come una massa solida ben circoscritta di tessitura granulare, leggermente iperecogena, con margini

regolarmente delimitati. La vascolarizzazione era uniformemente distribuita. Aree anecoiche erano presenti nel parenchima e al di fuori dei margini.

I proprietari hanno acconsentito al trattamento conservativo per preservare la fertilità e l'integrità delle ghiandole mammarie. La mastectomia non è stata eseguita in nessun caso. Le gatte non gravide (C1, C2, C3 e C4) sono state trattate per due giorni consecutivi con iniezioni sottocutanee di 15 mg/kg di aglepristone (ALIZIN; Virbac, Carros, Francia).



Figura 1. Caso C1. Grave FAC con ghiandole mammarie ulcerate e dolorose. Scomparsa dei segni clinici dopo 2-3 settimane con la combinazione di farmaci e nutraceutici proposta. (b) Caso C7. Gatta Persiana gravida con ghiandole mammarie ingrossate (FAC) e cute infiammata; 21 giorni dopo il trattamento, si noti l'involuzione delle ghiandole mammarie. (c) Caso C8. Una femmina di gatto domestico a pelo corto di 1 anno, con FAC e ulcere, durante la gravidanza, trattata senza aglepristone per preservare la cucciolata.

Il trattamento è stato continuato settimanalmente con una singola iniezione fino alla scomparsa dei segni clinici. Nei casi in cui erano evidenti segni di ulcere, infiammazione o necrosi in almeno una ghiandola mammaria, sono stati somministrati 12,5 mg/kg q 12 ore di amoxicillina/acido clavulanico in compresse (SYNULOX; Zoetis, Roma, Italia) e 0,1 mg/kg q 24 ore di meloxicam (MELOXORAL sospensione orale 0,5/ml; Dechra Veterinary Products, Torino, Italia) per il primo giorno, seguiti da 0,05 mg/kg q 24 ore per 5-6 giorni.

Inoltre, è stato somministrato un integratore alimentare orale contenente maltodestrina e bromelina (BROSPET; Aurora biofarma, Milano, Italia) una volta al giorno per il periodo di trattamento.

Le ulcere sono state trattate topicamente due volte al giorno con una crema contenente iperico ed estratto di neem (HYPERMIX; Rimos, Mirandola, MO, Italia).

Le ghiandole mammarie ingrossate sono state massaggiate quotidianamente con un gel emolliente a base di Aloe vera (ALOPET GEL; linea Angel Ariel, Grancona, VI, Italia). Due delle quattro gatte gravide sono state trattate con lo stesso schema per la grave tumefazione e ulcerazione delle ghiandole mammarie (C5) e in considerazione di segni di riassorbimento fetale, dedotti dal rallentamento della frequenza cardiaca e dall'aumento dell'ecodensità del liquido amniotico (C6).

Risultati

Dopo 1 settimana, le gatte hanno presentato perdite vaginali sanguinolente e grazie all'ecografia si è rivelata la presenza di quattro residui di placenta in una gatta (C6). Quindi, è stato somministrato cloprostenolo (ESTRUMATE; MSD Animal Health, Segrate, MI, Italia) al dosaggio di 1,5 mcg/kg per tre giorni consecutivi per facilitare lo svuotamento uterino. Due gatte gravide (C7 e C8) sono state trattate con lo stesso schema senza l'utilizzo dell'aglepristone per preservare le cucciolate. In tutti i casi studiati, dopo 2-3 settimane la ghiandola mammaria si è ridotta di dimensioni, non sono state rilevate ulcere o aree necrotiche e dopo 4-5 settimane la lesione non era più riconoscibile. A termine, le gatte gravide C7 e C8 hanno partorito quattro e tre gattini, che sono stati allattati normalmente e svezzati dopo 40 giorni (Figura 1c). La serie di

casi è riassunta nella Tabella 3. Al follow-up dopo 1 anno non è stata rivelata la presenza di recidive di FAC negli animali trattati.

Discussioni e conclusioni

La FAC è caratterizzata da una rapida crescita della ghiandola mammaria come risposta esagerata alle prime esposizioni al progesterone. Il primo obiettivo dell'approccio terapeutico si basa sulla rimozione del progesterone. L'aglepristone agisce bloccando i recettori del progesterone e i risultati di questa serie di casi confermano che è il farmaco di prima linea per il trattamento della FAC (Görlinger et al., 2002), soprattutto nelle gatte non gravide e trattate con progestinici. Purtroppo, nelle gatte gravide, dove il mantenimento della gravidanza richiede anche la presenza di progesterone, non possono essere trattate con l'aglepristone in quanto questo causerebbe un aborto (Görlinger et al., 2002). Inoltre, è stato dimostrato che il farmaco non funziona bene nella gatta come agente abortivo, non essendo in grado di svuotare l'utero. Infatti, sono stati segnalati numerosi casi di endometriti e di placenta o feti ritenuti (Görlinger et al., 2002; Fieni et al., 2006; Georgiev et al., 2006). L'uso di un ecbolico come la prostaglandina è quindi raccomandato in associazione (Fieni et al., 2006).

L'esperienza clinica indica che ulcere, necrosi e mastiti sono i principali rischi della FAC e compromettono la completa involuzione della ghiandola anche dopo la terapia. In questi casi, può essere presa in considerazione la mastectomia parziale o totale (Payan-Carreira, 2013) con perdita del valore riproduttivo della gatta. Inoltre, il trattamento antimicrobico ad ampio spettro e i farmaci antinfiammatori non steroidei possono aiutare a trattare le ghiandole mammarie infette, infiammate e dolorose (Payan-Carreira, 2013).

Questa serie di casi, suggerisce che la terapia adiuvante può facilitare l'involuzione, riducendo l'edema, l'infezione e le alterazioni necrotiche. Nonostante il basso numero di casi di gatte gravide, l'approccio terapeutico proposto ha permesso di preservare l'integrità della ghiandola mammaria senza la necessità di una mastectomia. La frequente comparsa di edema ha suggerito l'uso di un integratore alimentare contenente maltodestrina e bromelina, in quanto queste sostanze riducono

l'edema, gli ematomi, il dolore e il tempo di guarigione in seguito a traumi o interventi chirurgici (MacKay et al., 2003). Una medicazione topica delle ulcere in FAC con neem e iperico è stata applicata per l'elevata attività antiossidante, antinfiammatoria e antimicrobica (Wölfle et al., 2014). Infine, è stato effettuato un massaggio energetico con creme emollienti per facilitare la circolazione mammaria e dare sollievo alla gatta. La scelta di un'applicazione topica di aloe è supportata dalla sua proprietà farmacologica antinfiammatoria e anti-edema e dalla presenza di fattori angiogenici (Drudi et al., 2018).

In due casi di gravidanza con FAC, il protocollo è stato modificato per preservare le cucciolate eliminando l'aglepristone e sfruttando il normale calo del progesterone a fine gravidanza. Dopo il parto, la FAC può evolvere in mastite (Burstyn, 2010; Payan-Carreira, 2013). È stato riportato che i gattini non sono in grado di allattare in modo soddisfacente, con morte della prole in un breve periodo di tempo (Payan-Carreira, 2013). In questa serie, i due casi gravidi hanno allattato e svezzato normalmente i gattini, nonostante la presenza di un grave FAC con alterazioni necrotiche alla presentazione. Considerando i tempi di recupero simili nei casi riportati, è possibile ipotizzare che, nelle gatte non gravide, il calo del progesterone dopo la pseudogravidanza possa agire allo stesso modo e che l'aglepristone, in alcuni casi specifici, possa non essere somministrato. Questi risultati e considerazioni sulla FAC richiedono sicuramente ulteriori studi.

Questi risultati sono stati oggetto della seguente pubblicazione: Marino G, Pugliese M, Pecchia F, Garufi G, Lupo V, Di Giorgio S, Sfacteria A. Conservative treatments for feline fibroadenomatous changes of the mammary gland. *Open Vet J.* 2021 Oct-Dec;11(4):680-685. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i4.19>.

TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES (TILS) NEI TUMORI MAMMARI DEL GATTO: SIGNIFICATO E POSSIBILI RISVOLTI TERAPEUTICI

I tumori mammari felini sono stati selezionati dagli archivi delle Unità di Patologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Messina. Di tutti i casi non è stato possibile risalire ai soggetti per avere notizie circa il follow-up post-operatorio.

Materiali e metodi

Ogni caso è stato fissato in formalina al 10%, incluso in paraffina, tagliato al microtomo in sezioni di 5 µm colorate con ematossilina-eosina (EE). Sono stati quindi eseguiti la diagnosi, in accordo con la classificazione proposta da Zappulli et al., 2019 e il grading secondo Mills et al., 2015.

La valutazione dei TILs è stata eseguita da un singolo patologo secondo le linee guida proposte dall' International TILs Working Group 2014 per la valutazione dei TILs nel cancro del seno (Salgado et al., 2015), impiegando un microscopio Zeiss Axiophot con telecamera digitale (Carl Zeiss Microscopy) collegata a pc e con l'utilizzo del software di acquisizione immagini Zeiss Zen Lite. Di ogni area è stata scattata una foto a 5x di ingrandimento; sulle singole aree stromali con TILs sono state acquisite anche immagini ad ingrandimenti microscopici di 10-20x per identificare la tipologia cellulare. Di ogni campione è stata valutata una sola sezione. Nella valutazione sono state incluse unicamente aree stromali non intratumorali, lontane dagli eventuali artefatti o da aree di necrosi escludendo inoltre le aree che presentavano neutrofili o macrofagi. Per ogni immagine ottenuta, è stata analizzata la quantità di cellule mononucleate e l'estensione delle aree stromali occupate impiegando il programma Imagej (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/index.html>) e da queste si otteneva l'area stromale media. Successivamente, attraverso una valutazione semiquantitativa, veniva attribuita una percentuale di infiltrazione linfocitaria stromale, valutando l'area

occupata da cellule infiammatorie mononucleari sull'area stromale intratumorale totale (Figura 2).

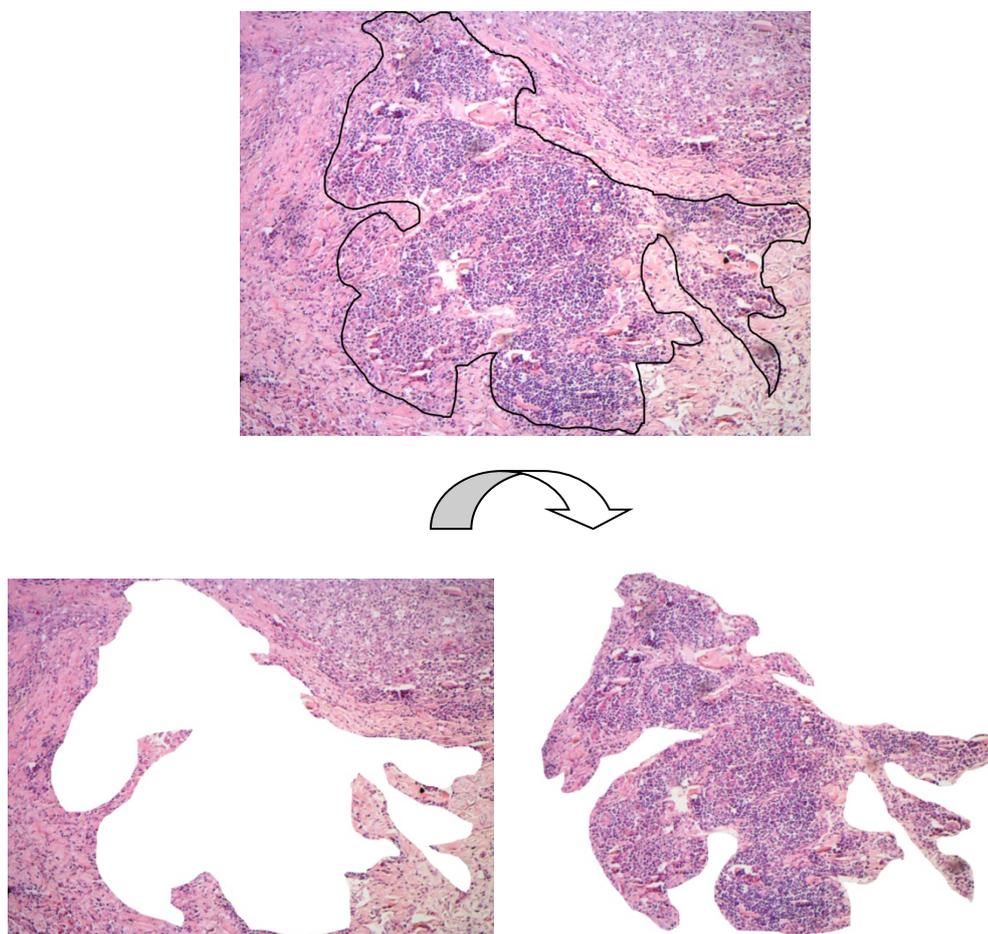


Figura 2. Carcinoma tubulare di grado 3. Valutazione dell'estensione dell'area di TIL secondo Salgado et al., (2015). Per la valutazione delle singole aree è stato impiegato il programma Image j, un programma informatico per l'elaborazione digitale di immagini, sviluppato dal National Institutes of Health degli Stati Uniti. Si mette in evidenza l'area stromale senza il TIL selezionato a sx. A dx, invece, area di TIL ottenuta a cui è stato attribuito un valore percentuale valutando l'intensità cellulare rispetto all'area stromale in cui si trova. In questo caso la percentuale attribuita è stata del 70%.

Ogni singolo caso osservato veniva incluso in uno dei tre gruppi suggeriti da Salgado e ad ogni gruppo corrispondeva uno score, ovvero:

- gruppo A (score 1): tumore senza infiltrato o con infiltrato minimo con una percentuale di TILs da 0% - 10%;
- gruppo B (score 2): tumore con infiltrato intermedio con una percentuale di TILs da 10% - 40%;
- gruppo C (score 3): tumore con un elevato infiltrato infiammatorio con una percentuale di TILs da 40% - 90%.

Risultati

L'esame istologico con EE ha permesso di emettere una diagnosi di carcinoma tubulopapillare (n°1), carcinoma intraduttale papillare (n°2), carcinoma solido (n°2), carcinoma tubulare (n°1), carcinoma micropapillare (n°1), comedocarcinoma (n°1) e adenocarcinoma squamoso (n°1). Nella Tab.3 sono riportati, per ogni istotipo, i valori riferiti a grading, area stromale totale e area media (μm^2), percentuale media di TILs, score e tipologia di infiltrato infiammatorio (Tabella 4). Nel supplemento alla tesi, sono riportati il questionario proposto da Salgado et al. (2015) (Appendice I) e i valori relativi a tutte le aree valutate per ogni campione (Appendice II) da utilizzare per la corretta applicazione del metodo.

| | Grado | area tot | area media | media TILs % | Score | |
|---|--------------|-----------------|-------------------|---------------------|--------------|---|
| Carcinoma tubulopapillare | 2 | 2003194 | 667731 | 47 | 3 | Infiltrato prevalentemente plasmacellulare |
| Carcinoma intraduttale papillare | 3 | 3615896 | 903974 | 66 | 3 | Infiltrato prevalentemente linfocitario |
| Carcinoma solido | 2 | 3948722 | 232278 | 36 | 2 | Infiltrato prevalentemente ricco in plasmacellule |
| Carcinoma solido | 3 | 5774296 | 206225 | 47 | 3 | Infiltrato prevalentemente linfocitario |
| Carcinoma tubulare | 3 | 4711516 | 314102 | 35 | 2 | Infiltrato prevalentemente plasmacellulare |
| Carcinoma micropapillare | 3 | 36587653 | 98090 | 34 | 2 | Infiltrato prevalentemente ricco in plasmacellule |
| Comedocarcinoma | 3 | 1912600 | 76504 | 20 | 2 | Infiltrato prevalentemente linfocitario |
| Adenocarcinoma squamoso | 3 | 28246564 | 117206 | 30 | 2 | Infiltrato prevalentemente linfocitario |
| Carcinoma intraduttale papillare | 1 | 3986720 | 35596 | 20 | 2 | Infiltrato prevalentemente |

Tabella 4. Casi clinici per ogni sottotipo di tumore mammario felino classificati secondo grado, area totale delle sezioni, area media, percentuale media dei TILs, score.

I dati sono stati quindi riportati in excel e valutati con l'ausilio di istogrammi per la corretta interpretazione dei dati. Dal confronto tra grado e score (Figura 3), si evince che il carcinoma tubulopapillare di grado 2 (area media 667731), il carcinoma solido di grado 3 (area media 206225) e il carcinoma intraduttale papillare di grado 3 (area media 903974) presentavano uno score pari a 3.

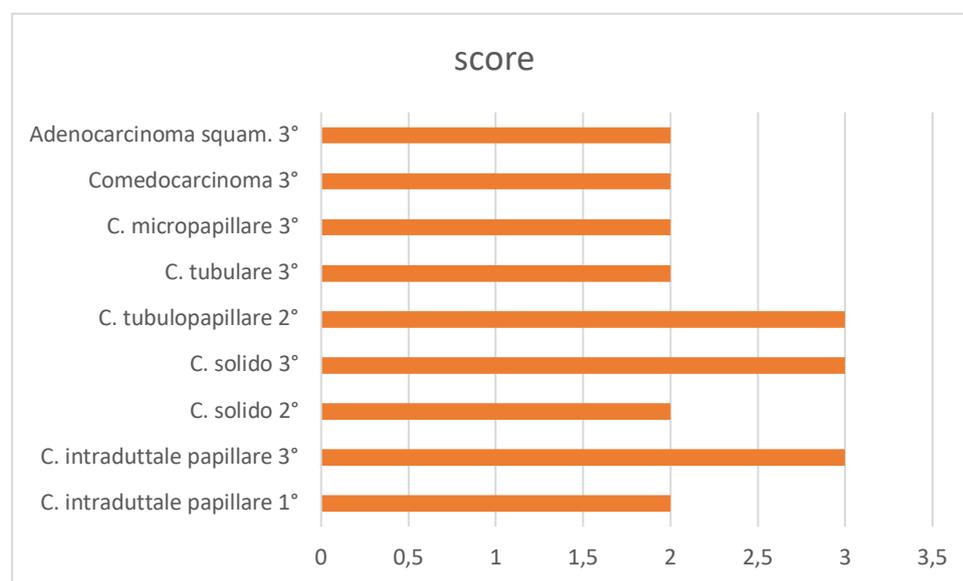


Figura 3. Rappresentazione grafica della relazione tra grado istologico e score.

Adenocarcinoma squamoso di grado 3 (area media 117206), comedocarcinoma di grado 3 (area media 76504), carcinoma micropapillare di grado 3 (area media 98090), carcinoma tubulare di grado 3 (area media 314102), carcinoma solido (area media 206225) e carcinoma intraduttale papillare di grado 1 (area media 35596) avevano uno score pari a 2. È stata messa in relazione l'area media stromale e il grado istologico (Figura 4). I dati ottenuti evidenziavano che la maggioranza dei tumori mammari esaminati, indipendentemente dall'istotipo e dal grado istologico elevato mostravano valori omogenei.

Gli unici dati apparentemente contrastanti riguardavano il carcinoma intraduttale papillare di grado 3 e il carcinoma tubulopapillare di grado 2.

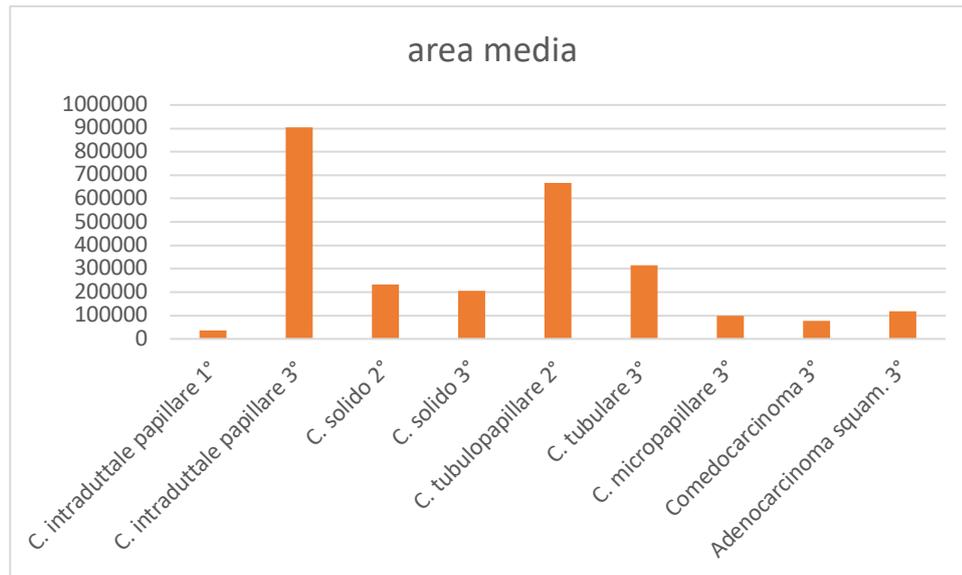


Figura 4. Confronto tra area media stromale e grado istologico.

Discussioni e conclusioni

Nonostante il numero ridotto di casi non permetta di avere dei valori significativi al livello statistico, si può comunque affermare che il metodo proposto da Salgado et al. può essere agevolmente applicato allo studio dei TILs stromali dei tumori della ghiandola mammaria di gatto. Inoltre, aumentando la casistica e avendo un follow-up da mettere in relazione allo score, la % di TILs potrebbe permettere di attribuire un valore prognostico ai TILs. Dai nostri risultati possiamo affermare che tumori molto aggressivi appaiono ampiamente infiltrati di cellule mononucleate nella gatta. I TILs appaiono molto numerosi nell'ambiente stromale peritumorale, lungo i margini di invasione e soprattutto in prossimità di emboli metastatici linfovaskolari.

Confrontando il grado istologico con lo score ottenuto dalla percentuale di TILs stromali abbiamo osservato una correlazione nei casi di carcinoma solido e carcinoma intraduttale e una correlazione negativa al grado negli altri casi. Come già detto prima, gli unici dati che risaltavano da tali grafici erano da associare alla dimensione della sezione stessa. Nonostante molto aggressivi non tutti i tumori di grado 3 da noi studiati hanno evidenziato un'elevata area media di TILs, mentre in percentuale questi tumori appaiono più ricchi di TILs rispetto al carcinoma intraduttale papillare di grado 1. Solo

nel carcinoma intraduttale papillare e nel carcinoma duttale papillare abbiamo osservato una correlazione positiva tra area media di TILs e grado istologico.

Nella specie felina non abbiamo inoltre riscontrato veri e propri organi linfoidi ectopici che si sviluppano in tessuti non linfoidi nei siti di flogosi cronica inclusi i tumori chiamate “strutture linfoidi terziari” o “TLS”, molto studiati in medicina umana. Sono state identificate le caratteristiche comuni tra la genesi degli organi linfoidi secondari e i TLS: questi, infatti, esistono sotto differenti stati di maturazione nei tumori, culminanti in centri germinali. L’importanza dello studio dei TLS ha significato prognostico nei pazienti oncologici umani, poiché essi sono alla base della loro risposta immunitaria antitumorale. Sull’importanza in medicina umana di queste strutture nell’ambito della regressione tumorale si è molto discusso tuttavia nella specie felina si può solo ipotizzare un medesimo meccanismo di controllo dello sviluppo tumorale sebbene veri e propri organi linfoidi nel microambiente stromale non siano stati ancora identificati. A tal proposito, sarebbe interessante approfondire la loro eventuale presenza, per valutarne l’aspetto e la funzione in relazione all’intensità di TILs presenti.

I risultati ottenuti con il presente lavoro, anche se preliminari, dimostrano che anche nei tumori mammari del gatto la metodica di valutazione dei TILs, creata per il cancro al seno, può essere utilizzata agevolmente e potrebbe contribuire a rendere più affidabili e predittivi i sistemi di grading istologici finora proposti.

TUMORI DELLA GHIANDOLA MAMMARIA DEL CANE

Classificazione istologica dei tumori mammari della cagna

Recentemente la “WHO International histological classification of tumors of domestic animals” relativa ai tumori mammari è stata rivista e pubblicata nel testo “Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals Volume 2: Mammary Tumors” (Zappulli et al., 2019). Tra le lesioni preneoplastiche si annoverano l'*Iperplasia/displasia*, un insieme di cambiamenti preneoplastici che macroscopicamente si presentano come ispessimenti diffusi e di consistenza spugnosa; l'*Ectasia duttale* nella quale si distinguono cellule da colonnari a cuboidali che delimitano dotti dilatati con possibile rottura degli stessi cui si accompagna una fibrosi periferica. Quest'ultima non rappresenta una lesione premaligna, ma, se accompagnata da atipia delle cellule epiteliali, può essere associata a carcinoma. L'*Iperplasia lobulare* è spesso associata a neoplasie ed è caratterizzata da una proliferazione dei dotti intralobulari e degli alveoli. Se ne riconoscono quattro tipi: l'iperplasia lobulare regolare, con aumento dei numeri di dotti e alveoli per lobuli ma senza atipia cellulare; l'iperplasia con attività secretoria lattazionale, con alveoli variamente distesi e circondati da cellule cuboidali secernenti con accumulo di secrezioni nei dotti; l'iperplasia lobulare con fibrosi, caratterizzata dalla presenza di tessuto connettivo fibroso inter e intralobulare; l'iperplasia lobulare con atipia, rappresentata da anisocariosi, anisocitosi e qualche mitosi con una disorganizzazione dell'architettura lobulare. L'*Epiteliosi*, un'altra lesione preneoplastica e possibile precursore del carcinoma, è caratterizzata dalla presenza di cellule epiteliali che formano piccoli e solidi aggregati di cellule che spesso riempiono il lume dei dotti, potendo anche formare piccoli cordoni e tubuli. Nella *Papillomatosi* si distinguono proiezioni papillari intraduttali che si sviluppano in più dotti con un supporto stromale fibrovascolare.

I tumori benigni si classificano in semplici, non semplici e duttali. Tra i tumori semplici benigni si distinguono: l'*Adenoma semplice* caratterizzato da cellule epiteliali che sono organizzate in tubuli delimitati da un singolo o doppio strato cellulare. Il lume può contenere un quantitativo variabile di secrezioni, ma mancano i caratteri di malignità; il *Mioepitelioma* caratterizzato dalla proliferazione di cellule a fusate a stellate arrangiate in piccoli gruppi e incorporati in un materiale basofilo fibrillare extracellulare (matrice mixoide). Le cellule hanno confini poco marcati, poco citoplasma e nuclei rotondi. Tra i tumori benigni non semplici si distinguono l'*Adenoma complesso (adenomioepitelioma)* che è uno dei tumori più comuni con una proliferazione benigna sia di cellule mioepiteliali che cellule epiteliali luminali; il *Tumore misto benigno* coinvolge sia le cellule epiteliali luminali che le cellule mioepiteliali interstiziali e il mesenchima. Le prime sono disposte a formare tubuli o papille, mentre le seconde sono a fusate a stellate. Entrambe le popolazioni cellulari sono associate ad una matrice mixoide con aree di cartilagine e matrice ossea disposta multifocalmente, il *Fibroadenoma* caratteristico è uno stroma esteso che circonda i tubuli, con fibroblasti dai nuclei allungati e scarso citoplasma. Tra i tumori benigni duttali associati si distinguono: l'*Adenoma duttale* caratterizzato da cellule che si organizzano in cordoni e tubuli con la formazione di lumi simili a fessure. Le cellule luminali sono cuboidali o poligonali e possono essere presenti aree di cheratinizzazione senza atipia; l'*Adenoma papillare intraduttale* nel quale vi è una crescita intraduttale, papillare e arborescente supportata da un peduncolo fibrovascolare.

Tra le neoplasie maligne si riconoscono tre gruppi: carcinomi semplici, carcinomi non semplici e carcinomi duttali associati. Tra i carcinomi semplici si distinguono: il *Carcinoma tubulare* caratterizzato da cellule epiteliali formano fasci tubulari con marcato pleomorfismo e altri criteri di malignità. Inoltre, dove le cellule neoplastiche infiltrano il tessuto mammario vicino, possono evocare una proliferazione di miofibroblasti; il *Carcinoma tubulopapillare* costituito più del 20% dei tubuli che hanno papille, supportate da uno stroma connettivale fibrovascolare, che protrudono nel lume; il *Carcinoma solido* le cui cellule epiteliali sono organizzate in nidi senza lumi, separati da uno stroma delicato e può coesistere con altri pattern; il *Carcinoma micropapillare invasivo* le cui cellule neoplastiche formano piccoli aggregati irregolari

e papille che non hanno supporto fibrovascolare e sono circondate da spazi lacunari vuoti; il *Comedocarcinoma* caratterizzato da un pattern multinodulare con un'area centrale ben definita in necrosi; il *Carcinoma anaplastico* che è l'istotipo più maligno che invade i tessuti vicini con cellule pleomorfe e arrangiate in cellule individuali, piccoli gruppi o righe, in associazione con altri pattern. Tra i carcinomi non semplici si distinguono: il *Carcinoma derivante da adenoma complesso/tumori benigni misti* che è una progressione maligna della controparte benigna; il *Carcinoma complesso* nel quale vi sono due popolazioni cellulari di cui una epiteliale maligna e una mioepiteliale benigna. Le cellule epiteliali formano tubuli o nidi e cordoni. Le cellule mioepiteliali, da fusate a stellate, si espandono nell'interstizio e si associano a matrice fibrillare; il *Carcinoma e mioepitelioma maligno* nel quale entrambe le popolazioni presentano caratteri di malignità; il *Carcinoma misto* che è una neoplasia mista con componenti epiteliali luminali maligni, componenti mioepiteliali interstiziali benigni e cellule mesenchimali benigne con presenza di matrice cartilaginea o ossea. Tra i carcinomi duttali associati si distinguono: il *Carcinoma duttale*, controparte maligna dell'adenoma duttale, le cui cellule neoplastiche sono organizzate in cordoni, tubuli e aree solide e possono simulare la morfologia delle cellule mioepiteliali e il *Carcinoma papillare intraduttale* caratterizzato da proiezioni papillari che si estendono nel lume dei dotti mantenendo un supporto stromale fibrovascolare.

Inoltre, vi sono altre neoplasie epiteliali maligne tra cui: il *Carcinoma a cellule squamose* caratterizzato da cellule epiteliali a vario grado di cheratinizzazione con possibile formazione di perle cornee; il *Carcinoma adenosquamoso*, caratterizzato da aree di carcinoma a cellule squamose con aree di carcinoma con differenziazione ghiandolare; il *Carcinoma mucinoso* nel quale vi è un'abbondante produzione di mucina da parte di cellule epiteliali neoplastiche non accompagnata da proliferazione mioepiteliale; il *Carcinoma ricco in lipidi* la cui caratteristica è proprio la presenza di materiale lipidico con cellule neoplastiche dal citoplasma vacuolizzato; il *Carcinoma a "spindle cell"* caratterizzato da cellule epiteliali maligne e il *Carcinoma mammario infiammatorio*, che clinicamente si manifesta con edema, rossore e dolore, da cui deriva proprio l'attributo infiammatorio e per la conferma istologica è importante ritrovare emboli neoplastici nei vasi dermici linfatici.

Invece, tre le neoplasie mesenchimali si distinguono: l' *Osteosarcoma* che il sarcoma più comune nella ghiandola mammaria e che si presenta con osteoblasti maligni che producono matrice osteoide; il *Condrosarcoma*, la cui caratteristica è la presenza di matrice condroide e differenziazione di cellule neoplastiche in condrociti; il *Fibrosarcoma* che origina dallo stroma con proliferazione di cellule fusiformi a pattern intrecciato; l'*Emangiosarcoma* che è molto raro e il *Carcinosarcoma* che è una neoplasia in cui si associano una componente epiteliale maligna e una mesenchimale pure maligna.

Grading istologico

| CARATTERISTICHE | PUNTEGGIO |
|---|---------------|
| A. Formazione tubuli | |
| I tubuli comprendono >75% del tumore | 1 |
| I tubuli comprendono tra il 10-75% del tumore (formazione moderata di disposizioni tubolari mescolate con aree di pattern non tubolari) | 2 |
| I tubuli comprendono <10% del tumore (formazioni tubulari minime o assenti) | 3 |
| B. Pleomorfismo cellulare | |
| Nuclei uniformi, regolari, piccoli con occasionali piccoli nucleoli | 1 |
| Moderato grado di variazione della dimensione e forma del nucleo, nucleo ipercromatico, presenza di nucleoli (alcuni dei quali possono essere prominenti) | 2 |
| Marcata variazione nella dimensione nucleare, nucleo ipercromatico, spesso con schiarimento della paracromatina e uno o più nucleoli prominenti | 3 |
| C. Conta mitotica (mitosi per 10 HPF) | |
| 0-9 mitosi / 10 HPF | 1 |
| 10-19 mitosi / 10 HPF | 2 |
| >19 mitosi / 10 HPF | 3 |
| Grado Istologico (Punteggio totale A+B+C) | Totale |
| I (basso, ben differenziato). | 3-5 |
| II (intermedio, moderatamente differenziato) | 6-7 |
| III (elevato, poco differenziato) | 8-9 |

Tabella 5 Criteri per la classificazione istologica della mammella canina tumori Peña L. et al. Vet Pathol. 2013. 50(1):94-105

Il “Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals Volume 2: Mammary Tumors” (Zappulli et al., 2019) propone l'utilizzo del sistema di classificazione per i tumori mammari canini pubblicato da Peña et al., 2013 (Tabella 5) secondo il quale:

quando si classificano tumori complessi/misti, per la valutazione della formazione dei tubuli, devono essere considerate solo le aree epiteliali luminali; il pleomorfismo nucleare nei tumori complessi e misti dovrebbe essere valutato nella popolazione cellulare maligna; nei tumori non semplici, la conta mitotica dovrebbe includere sia le cellule epiteliali luminali che quelle mioepiteliali quando la componente mioepiteliale è maligna. Utilizzando questo sistema di classificazione, è stata riportata una sopravvivenza globale media > 38 mesi per i tumori di grado I, 32 mesi per i tumori di grado II e 20 mesi per i tumori di grado III.

STRUTTURE TERZIARIE LINFOIDI (TLS) NEI TUMORI MAMMARI DEL CANE: SIGNIFICATO E POSSIBILI RISVOLTI TERAPEUTICI

Materiali e metodi

Sono stati selezionati 50 casi, di cui quaranta erano carcinomi mammari semplici e dieci erano lesioni iperplastiche o displastiche (Tabella 6). I campioni sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina. Su sezioni in ematossilina ed eosina è stata condotta tramite microscopio un'attenta valutazione morfologica dell'infiltrato infiammatorio.

| Casi | Razza | Età | Istotipo | Grado |
|------|-------------------|------|---------------------------|-------|
| 1 | Cirneco dell'Etna | 7 | Carcinoma tubulare | I |
| 2 | Meticcio | s.c. | Carcinoma tubulare | I |
| 3 | Meticcio | 12 | Carcinoma tubulare | I |
| 4 | Jack Russel | 9 | Carcinoma tubulare | I |
| 5 | Meticcio | s.c. | Carcinoma tubulare | I |
| 6 | Meticcio | s.c. | Carcinoma tubulare | I |
| 7 | Chihuahua | 8 | Carcinoma tubulare | I |
| 8 | Beagle | 10 | Carcinoma tubulare | II |
| 9 | Meticcio | 11 | Carcinoma tubulare | II |
| 10 | Yorkshire terrier | 7 | Carcinoma tubulopapillare | I |
| 11 | Meticcio | 5 | Carcinoma tubulopapillare | I |
| 12 | German Shepherd | 11 | Carcinoma tubulopapillare | I |
| 13 | Yorkshire terrier | 10 | Carcinoma tubulopapillare | I |
| 14 | Beagle | 8 | Carcinoma tubulopapillare | I |
| 15 | Yorkshire terrier | 4 | Carcinoma tubulopapillare | II |
| 16 | Cocker Spaniel | 15 | Carcinoma tubulopapillare | II |
| 17 | Cocker Spaniel | 10 | Carcinoma tubulopapillare | II |
| 18 | Rottweiler | 9 | Carcinoma tubulopapillare | II |
| 19 | Meticcio | 9 | Carcinoma tubulopapillare | II |
| 20 | Meticcio | s.c. | Carcinoma tubulopapillare | II |
| 21 | Breton | 8 | Carcinoma micropapillare | II |
| 22 | Shih-Tzu | 10 | Carcinoma micropapillare | II |
| 23 | German Shepherd | 5 | Carcinoma micropapillare | II |
| 24 | Jack Russel | 5 | Carcinoma micropapillare | II |
| 25 | Jack Russel | 7 | Carcinoma micropapillare | II |
| 26 | German Shepherd | 10 | Carcinoma micropapillare | II |
| 27 | Yorkshire terrier | 7 | Carcinoma micropapillare | III |
| 28 | Dalmata | 8 | Carcinoma micropapillare | III |
| 29 | Meticcio | s.c. | Carcinoma micropapillare | III |
| 30 | Pitbull | 9 | Carcinoma micropapillare | III |

| | | | | |
|----|-------------------|------|--------------------------------|-----|
| 31 | Golden retriever | 8 | Carcinoma solido | II |
| 32 | Meticcio | 10 | Carcinoma solido | II |
| 33 | Meticcio | 14 | Carcinoma solido | II |
| 34 | Meticcio | 12 | Carcinoma solido | II |
| 35 | Shar Pei | 6 | Carcinoma solido | II |
| 36 | Chihuahua | 9 | Carcinoma solido | II |
| 37 | Jack Russel | 10 | Carcinoma solido | II |
| 38 | Meticcio | s.c. | Carcinoma solido | III |
| 39 | Meticcio | 8 | Carcinoma solido | III |
| 40 | Rottweiler | 9 | Carcinoma anaplastico | III |
| 41 | Volpino | 13 | Iperplasia/Displasia | |
| 42 | Meticcio | 9 | Iperplasia/Displasia | |
| 43 | German Shepherd | s.c. | Iperplasia/Displasia | |
| 44 | Meticcio | 6 | Iperplasia/Displasia | |
| 45 | Yorkshire terrier | 5 | Iperplasia/Displasia | |
| 46 | Barbone | 10 | Iperplasia/Displasia | |
| 47 | Meticcio | s.c. | Iperplasia lobulare con atipia | |
| 48 | Siberian Husky | 10 | Iperplasia/Displasia | |
| 49 | Barbone | 6 | Iperplasia lobulare con atipia | |
| 50 | Siberian Husky | 8 | Iperplasia/Displasia | |

Tabella 6. Lista dei casi considerati con relativo istotipo e grading. (s.c. sconosciuto).

Nella valutazione sono state incluse unicamente aree stromali non intratumorali, lontane dagli eventuali artefatti o da aree di necrosi escludendo inoltre le aree che presentavano neutrofilo o macrofagi. È stata quindi eseguita l'immunoistochimica per tipizzare le cellule infiammatorie e le molecole di interesse nel microambiente tumorale. Sezioni di 5 µm su vetrini rivestiti di poli-L-lisina sono state sottoposte a smascheramento dell'antigene mediante trattamento con il calore (microonde 650W) in tampone citrato a pH 6 o EDTA a pH 8. È stato utilizzato perossido di idrogeno per bloccare le perossidasi endogene e un reagente bloccante per bloccare le reazioni proteiche non specifiche (ChemCruz - UltraCruz Blocking Reagent, Santa Cruz Biotechnology). Le sezioni sono state quindi incubate con gli anticorpi primari selezionati (Tabella 7), per una notte a 4 °C.

| Antibody I | Clone | Specificity | Dilution | Brand |
|----------------------------|----------|-----------------------------------|----------|--------------------------|
| Mast cell Tryptase | 10D11 | Mast cells | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology |
| Macrophage Marker | MAC/387 | Macrophages | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology |
| CD3 | | T lymphocytes | 1:50 | Santa Cruz Biotechnology |
| CD20 | D-10 | B lymphocytes | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology |
| CD21 | A-3 | Follicular dendritic cells (FDCs) | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology |
| MECA-79 | MECA-79 | High endothelial venules (HEVs) | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology |
| Sheep Anti-canine IgG:FITC | OBT4041F | Immunoglobulin G dog | 1:50 | Oxford Biotechnology |
| Mouse Anti-human IgG:FITC | HP-6017 | ImmunoglobulinG human | 1:50 | Sigma |
| Antibody II | Clone | Specificity | Dilution | Brand |
| Goat anti-mouse IgG-B | | Mouse IgG | 1:100 | BioSpa, Milan |
| Donkey anti-goat IgG-B | | Goat IgG | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology |

Tabella 7. Anticorpi primari e secondari.

Come metodo di rivelazione, sono stati applicati anticorpi secondari coniugati con biotina o HRP, seguiti da un'incubazione con streptavidina acetilata (prodotti antibiotici Biospa, Milano; solo per anticorpi coniugati con biotina). Per la colorazione della reazione immunitaria sono stati utilizzati i substrati enzimatici Vector Vip o DAB (diaminobenzidina, Vector), seguiti da una controcolorazione nucleare con ematossilina o verde luce.

Risultati

Dalla valutazione comparativa tra i diversi istotipi neoplastici, è emerso che le cellule infiammatorie erano invariabilmente presenti nello stroma peritumorale.

La tipologia cellulare coinvolta variava, tuttavia, in base all'aspetto istologico, evidenziando una popolazione composta soprattutto da mastociti e macrofagi a ridosso delle aree con iperplasia e displasia. In prossimità delle aree neoplastiche l'infiltrato variava verso una popolazione prettamente linfocitaria e plasmocitaria. La distribuzione dell'infiltrato nelle aree stromali si presentava in modo più o meno uniforme, in vicinanza dei vasi e in prossimità dell'area tumorale, in alcuni casi con l'aspetto di bande e in altri come aggregati più cospicui (Figura 5).

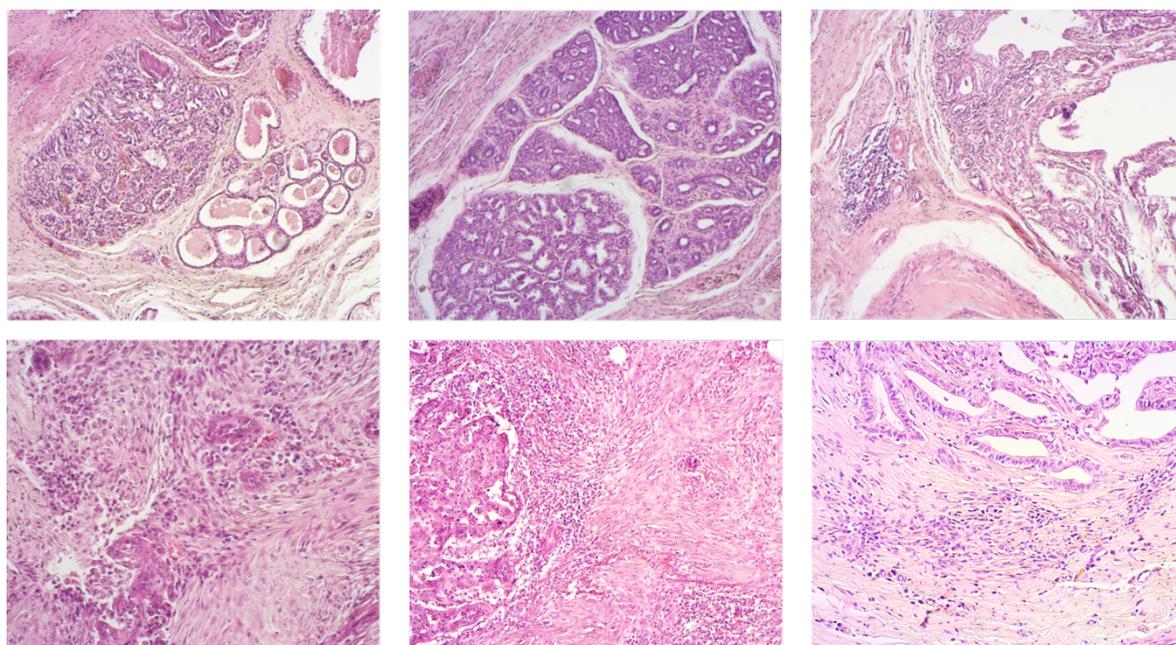


Figura 5. L'esame istologico evidenziava una popolazione composta soprattutto da mastociti e macrofagi a ridosso delle aree con iperplasia e displasia. In prossimità delle aree neoplastiche l'infiltrato variava verso una popolazione prettamente linfocitaria e plasmocitaria.

L'indagine immunohistochimica con CD3, specifico per tutti i linfociti T, mostrava che gli infiltrati stromali erano in prevalenza costituiti da linfociti T con una minima rappresentanza di cellule positive a IgG (Figura 6 a, b). I macrofagi, marcati con macrophage marker, erano numerosi ma distribuiti in maniera sparsa, in sede peritumorale e intratumorale, e indipendentemente dagli infiltrati linfoplasmacellulari (Figura 6 c).

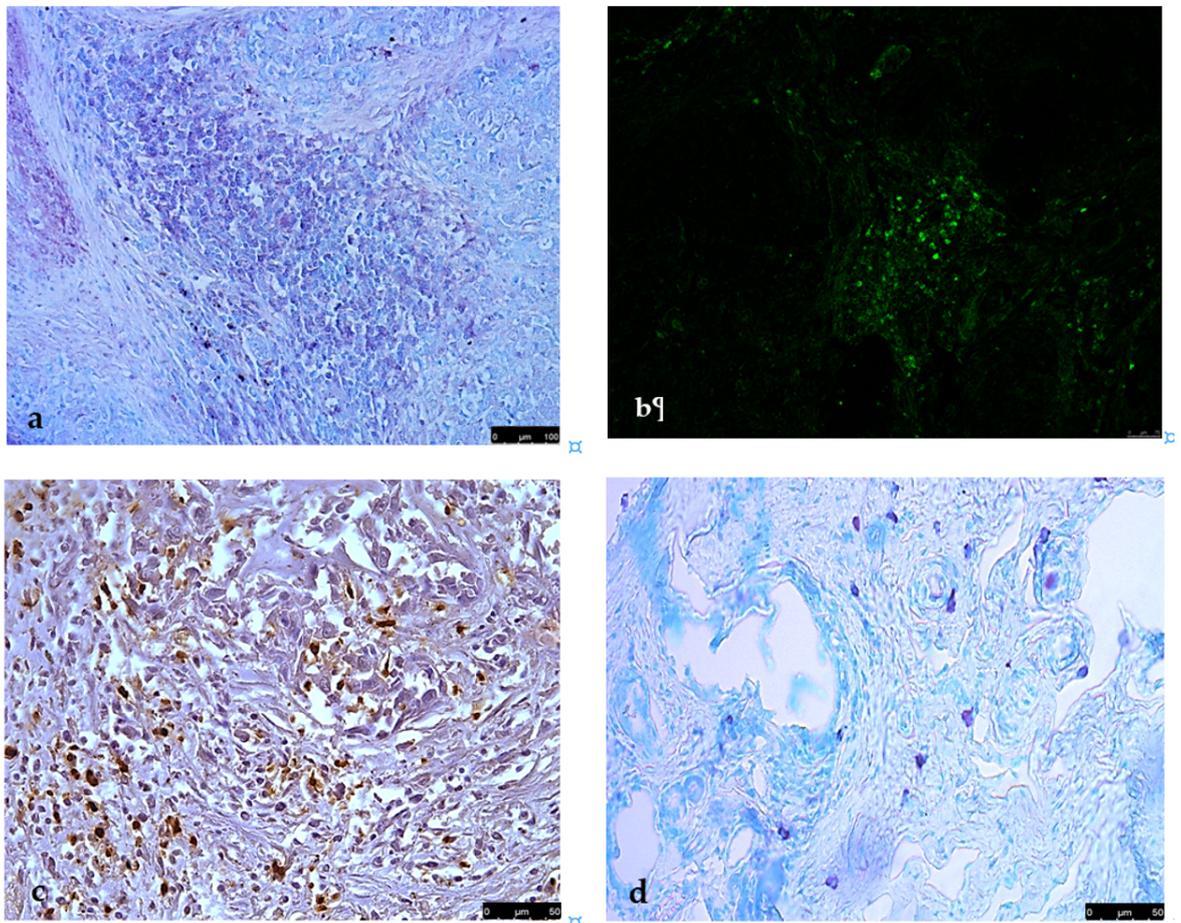


Figura 6. Infiltrati stromali costituiti in prevalenza da (a) linfociti T (CD3, Vector Vip, 5×); (b) cellule positive a IgG (IgG, FITC, 10×); (c) macrofagi numerosi ma distribuiti in maniera sparsa, in sede peritumorale e intratumorale (MAC/387, DAB, 20×); (d) mastociti in aree iperplastiche/displastiche (MC tryptase, Vector Vip, 10×).

I mastociti, evidenziati con il mast cell tryptase e positivi anche per Epo/EpoR, erano presenti in maggior numero nelle aree iperplastiche/ displastiche e lungo i margini di invasione delle neoplasie maligne (Figura 11d). Solo in prossimità dei carcinomi di grado più elevato, nello stroma peritumorale, talora si riscontrava la presenza di infiltrati infiammatori con una disposizione differente, simil-follicolare: numerose cellule di tipo linfoide assumevano un andamento concentrico intorno ai vasi integri o contenenti emboli neoplastici (Figura 7).

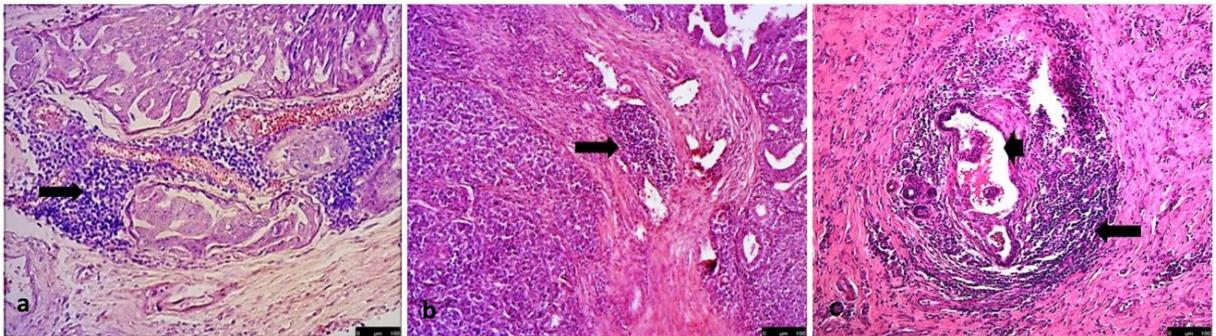


Figura 7. Nei carcinomi di alto grado, (a) carcinoma tubulopapillare (10x) e (b) carcinoma solido (10x), gli infiltrati infiammatori presentano una disposizione simil-follicolare con numerose cellule di tipo linfoide intorno ai vasi integri (freccia) oppure (c) contenenti emboli neoplastici (freccia, EE, 10x).

L'indagine immunohistochimica di questi casi, impiegando gli anticorpi in tabella 6, ha mostrato che i mastociti erano meno rappresentati, all'interno delle strutture follicolari, ma costantemente mescolati con i macrofagi e in una posizione perivascolare (Figura 8a). I macrofagi erano rappresentati e nelle aree più vicine ai vasi (Figura 8b). L'uso di CD21 ha rivelato la presenza di diverse cellule dendritiche follicolari (FDC), variamente localizzate sia nella parte esterna che in quella interna della struttura (Figura 8c).

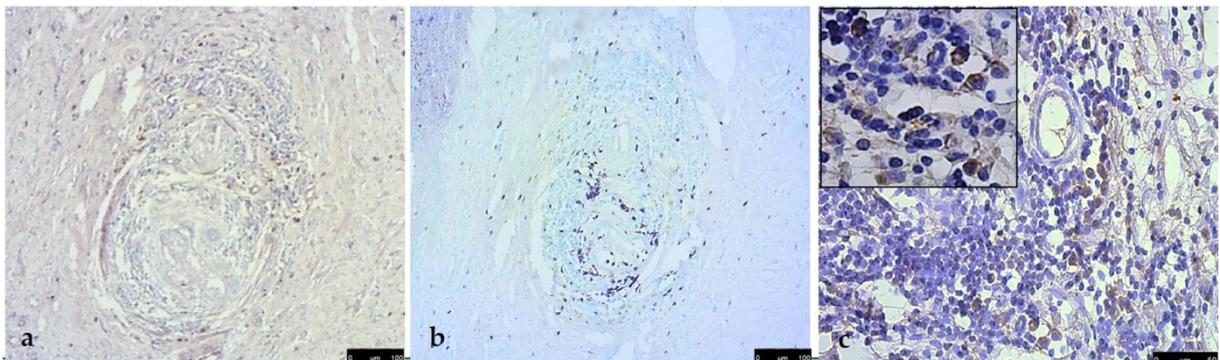


Figura 8. Immunoistochimica delle strutture follicolari: mastociti ((a), MC triptasi, Vector Vip, 10x); macrofagi ((b), MAC/387, Vector Vip, 10x). Cellule dendritiche follicolari (FDC) variamente localizzate sia nella parte esterna che in quella interna della struttura ((c), CD21, DAB, 20x; inserto, 40x).

I linfociti T ricercati dal CD3 erano localizzati prevalentemente, ma non esclusivamente, nelle aree più esterne in uno schema concentrico (Figura 9a). Invece, l'immunoistochimica con CD20 ha mostrato un'elevata positività concentrata nelle aree interne (Figura 9b). La restante popolazione infiammatoria ha rivelato un'intensa positività per il marcatore IgG ed è stata ipotizzata essere plasmacellule (Figura 9c). Inoltre, la presenza di strutture vascolari, già identificabili istologicamente come venule ad alto endotelio (HEV), è stata ulteriormente confermata dalla loro positività per MECA-79 (Figura 9d).

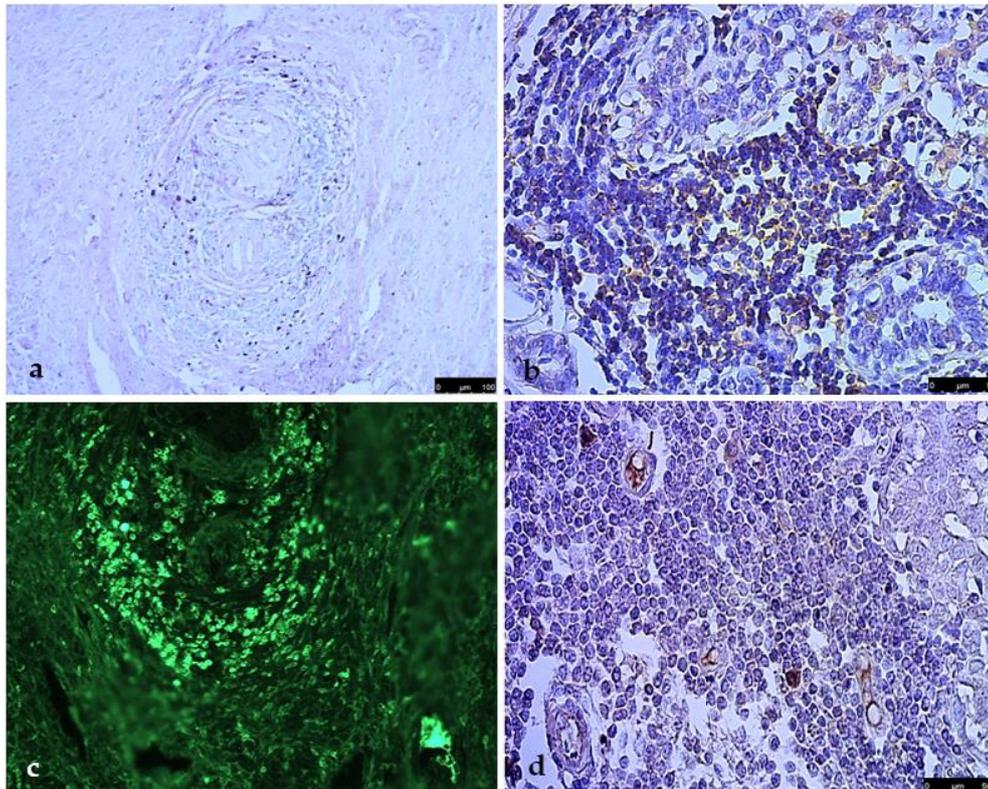


Figura 9. Nelle strutture follicolo-simili, i linfociti T sono localizzati principalmente nelle aree più esterne in uno schema concentrico ((a), CD3, Vector Vip, 10x), le cellule CD20+ sono nella parte interna ((b), DAB, 20x). La restante popolazione infiammatoria rivela un'intensa positività per il marcatore IgG ((c), FITC, 20x). La presenza di strutture vascolari come HEVs è confermata dalla positività per MECA-79 ((d), DAB, 20x).

È stata inoltre rilevata la completa assenza di infiltrato infiammatorio nel carcinoma in adenoma complesso che è caratterizzato da un'elevata proliferazione mioepiteliale benigna che circonda la proliferazione epiteliale maligna. Era costante in tutti i tumori con cospicua presenza di mioepitelio, la presenza di infiltrati linfocitari di dimensioni nettamente inferiori se comparati con quelli di altre tipologie tumorali.

Dalla valutazione comparativa tra carcinoma e mioepitelioma maligno è stato invece evidenziato che l'infiltrato era comunque ben rappresentato quando il mioepitelio stesso acquisiva caratteri di malignità. Nello stroma peritumorale, soprattutto nelle neoplasie a basso grado e ricche di mioepitelio, era costante il riscontro di un'ulteriore popolazione di cellule stromali, riunite anche in gruppi numerosi, molto voluminose, con citoplasma occupato da materiale di colore giallo-brunastro e nucleo non sempre evidenziabile, identificabili come le c.d. cellule schiumose (macrofagi carichi di lipidi). Tali cellule non mostravano immunopositività né per macrophage marker né per mast cell tryptase (Figura 10).

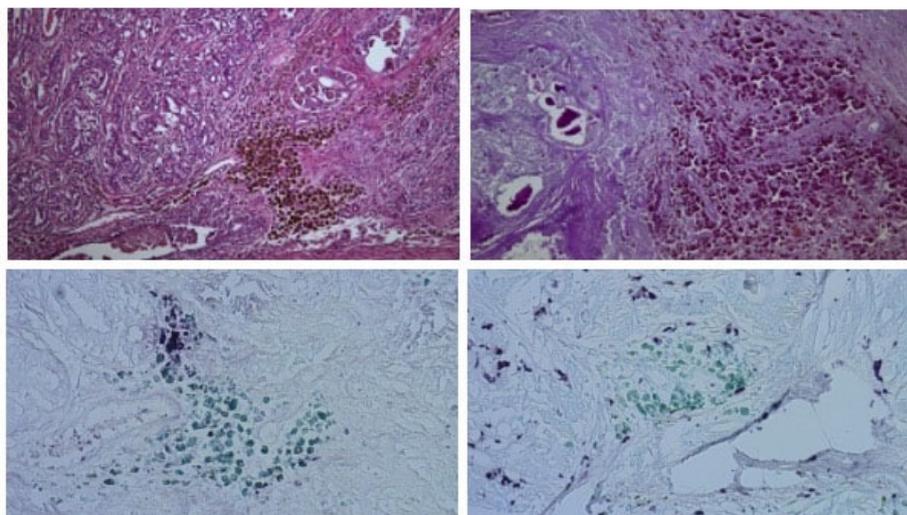


Figura 10. Gruppi di macrofagi carichi di lipidi nello stroma peritumorale (a). Tali cellule erano focalmente positive alla reazione di PAS (b) ma non mostravano immunopositività né per mast cell tryptase (c) né per macrophage marker (d). (EE, PAS e IHC, 5x)

Al fine di indagare ulteriormente la funzione delle cellule del microambiente stromale, sono state indagate anche le reazioni con Aven, due cloni anticorpali di Epo, e EpoR.

La positività ad Aven è risultata variabile con una maggiore presentazione in alcuni nidi di cellule epiteliali maligne, mentre in alcune aree la positività era maggiormente diffusa e non è stata riscontrata alcuna positività nelle cellule infiammatorie. Dal trattamento con EPOB4 è stata evidenziata una positività concentrata nelle aree stromali e in cellule riconosciute morfologicamente come macrofagi. Il clone EPO7D10 marcava invece cellule epiteliali, mastociti ed endotelio vascolare.

La positività per EPOR si presentava diffusa in alcune aree ed era maggiormente concentrata in nidi cellulari di epitelio neoplastico maligno corrispondente, su sezioni seriali, alle stesse aree dove era stata evidenziata la positività a EPO (Figura 11); inoltre si evidenziava una positività di cellule morfologicamente interpretabili come macrofagi e mastociti. Tutte le cellule infiammatorie positive a EPO/EPOR erano sempre distribuite in sede perivascolare o in stretta prossimità delle aree di infiltrazione neoplastica. Non sono state riscontrate positività nelle aree di infiltrazione linfoplasmocitaria o nelle strutture di tipo follicolare linfoide descritte in precedenza.

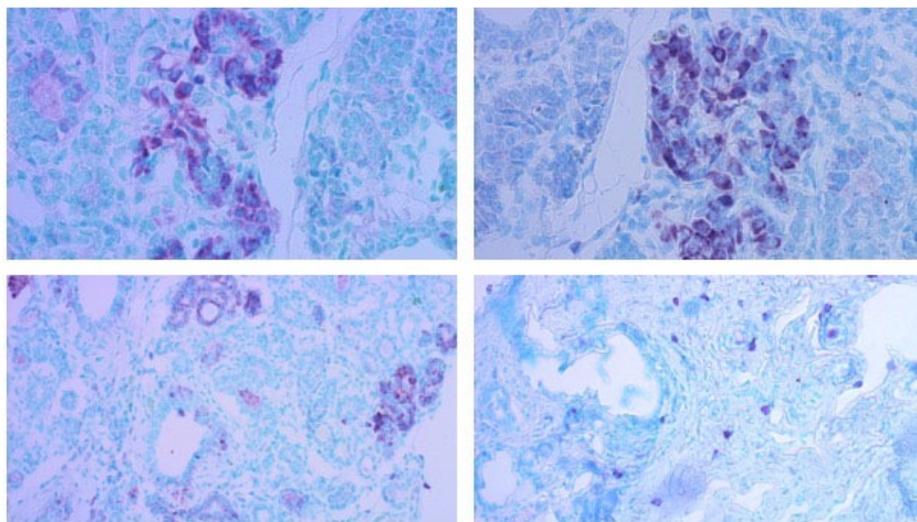


Figura 11. Positività a Aven, Epo e EpoR (a, b, c): in alcuni nidi di cellule con aspetti di malignità. Tutte le cellule infiammatorie positive a Epo/EpoR erano sempre distribuite in sede perivascolare o in stretta prossimità delle aree di infiltrazione neoplastica. (d, IHC, 5 e 10x).

Discussioni

Dai risultati emerge come l'infiltrato stromale fosse principalmente localizzato a livello perivascolare a conferma del richiamo tumorale dai vasi della componente immunitaria. Questa si presentava variabile in base all'istotipo con una proliferazione di cospicui infiltrati vicini a proliferazioni epiteliali maligne dove subentravano le cellule linfocitiche e macrofagiche secondo Sfactoria et al. 2021. Come già riportato in letteratura da Estrela-Lima et al., 2010 e Carvalho et al., 2014, la densità dei linfociti T era superiore a quella delle plasmacellule nella maggior parte degli infiltrati infiammatori. I risultati hanno invece dimostrato che, nelle aree morfologicamente simili a strutture linfoidi follicolari, la situazione era inversa poiché le cellule positive a IgG erano in maggioranza.

Nei tumori in cui contestualmente vi era una proliferazione mioepiteliale benigna gli infiltrati linfoplasmocitari erano scarsi o assenti. Nel tumore al seno l'individuazione del mioepitelio è impiegata come criterio diagnostico dai patologi per individuare istotipi a maggiore benignità e discernere tra il carcinoma in situ e quello invasivo (Yu et al., 1997). Ciò è legato all'ipotesi secondo cui il mioepitelio ha un effetto protettivo e funzionale nella lotta contro la neoplasia formando una sorta di barriera che isola l'epitelio proliferante, secernendo sostanze che ne bloccano la crescita e inducono l'apoptosi (Pandey et al., 2010). Il mioepitelio produce, infatti, inibitori competitivi delle metalloproteasi di matrice insieme a molecole come Maspin, che blocca la migrazione tumorale evitando le metastasi, e le caveoline, che bloccano la crescita tumorale (Zou et al., 1994; Williams et al., 2004).

Da quanto detto si comprende come il mioepitelio influenzi l'evoluzione della neoplasia condizionando anche i meccanismi che avvengono nel microambiente stromale. Ciò spiegherebbe il perché nel carcinoma complesso non sono stati rinvenuti infiltrati infiammatori. Tuttavia, nel carcinoma con mioepitelioma maligno, dove appunto le cellule mioepiteliali evolvono verso forme più maligne, l'infiltrato risultava presente con una maggiore percentuale di linfociti T CD3+ e una minima espressione di IgG. Se da un lato quanto osservato conferma l'effetto protettivo del mioepitelio, dall'altro lato si sottolinea anche il coinvolgimento della componente cellulare

immunitaria nel tumore che, proprio nel contesto della proliferazione mioepiteliale, risulta limitata.

I macrofagi, indipendentemente dalla presenza di mioepitelio, erano ben rappresentati e positivi al macrophage marker. Quest'ultimo è noto per marcare i macrofagi polarizzati M1 e, conoscendone il ruolo antitumorale, si potrebbe supporre che ancora questi rientrino in un tentativo dell'organismo di combattere l'invasione neoplastica o che rappresentino dei fenotipi che verranno successivamente convertiti a M2 ad opera del microambiente tumorale. La prima ipotesi potrebbe trovare maggiormente conferma proprio nella distribuzione macrofagica che si presentava variamente sparsa e non collegata all'infiltrato infiammatorio linfoplasmocitario.

Tuttavia, le forme più caratteristiche di strutture terziarie linfoidi sono state evidenziate solo negli istotipi a più alta malignità con localizzazione attorno ad emboli o vasi. L'andamento concentrico simulava un'organizzazione linfoide simile a quella descritta nel tumore al seno (Martinet et al., 2011). La composizione di queste formazioni risultava essere principalmente data in ordine di maggiore rappresentanza da plasmacellule, macrofagi, linfociti T e mastociti. Nonostante l'organizzazione delle strutture terziarie non rispecchiasse in toto una distribuzione cellulare analoga a quella delle strutture linfoidi secondarie, oggi si riconosce come le TLS siano delle realtà dinamiche a varia organizzazione da semplici ammassi di linfociti fino a strutture più complesse quali appunto le SLO (Colbeck et al., 2017; Engelhard et al., 2018). In realtà, ancora oggi, in medicina umana, non esiste un pieno accordo sui componenti cellulari che definiscono un TLS. Tuttavia, è riconosciuto che ci sono tre diversi stadi di maturazione. Il primo stadio è il meno organizzato e consiste in aggregati di linfociti T e B senza la presenza di FDC. I TLS primari simili a follicoli contengono FDC, ma non sono presenti centri germinali. Infine, anche i TLS secondari follicolo-simili completamente maturi presentano centri germinali (Schumacher et al., 2022). Una costante comune in queste diverse disposizioni è la distribuzione in vicinanza di venule ad alto endotelio proprio per il loro ruolo di coinvolgimento delle varie componenti cellulari che entrano a far parte delle TLS (Goc et al., 2014; Nerviani et al., 2018). È proprio sulla base di quanto detto che è possibile affermare che, data la loro costante evidenziazione proprio in vicinanza delle strutture vascolari, anche nella cagna le TLS risultano ben rappresentate con diversi gradi di organizzazione, a riflettere forse anche

un grado di coinvolgimento differente nella progressione tumorale secondo anche quanto riportato da Colbeck et al., 2017 e Posch et al., 2018.

Gli infiltrati infiammatori che abbiamo identificato erano sempre collocati in prossimità di strutture identificabili come venule dell'endotelio, sia istologicamente che immunohistochimicamente con MECA-79. Inoltre, nelle aree con patterning concentrico, i linfociti T CD3 + sono stati collocati principalmente nello strato esterno, circondando un'area ricca di cellule B CD20 + e plasmacellule. Anche in questo caso, è stato possibile individuare le FDC CD21+, variamente dislocate nella struttura. Da quanto dimostrato, quindi, possiamo affermare che strutture linfoide terziarie a diversi stadi di maturazione possono essere presenti anche nei tumori mammari canini. Gli aggregati ricchi di linfociti T possono essere considerati uno stadio precoce di maturazione e chiamati aggregati linfoide o TIL (infiltrati linfocitari tumorali). Nelle strutture simili a follicoli, la disposizione ordinata delle singole popolazioni cellulari e la presenza di FDC permette di riconoscere il secondo stadio di maturazione (follicolo primario).

L'elevata positività per le IgG, correlata alla malignità dell'istotipo analizzato, conferma ulteriormente quanto già evidenziato in un nostro studio (Sfacteria et al., 2021) e trova accordo con quanto riferito in Medicina Umana. Infatti, esiste una correlazione tra l'espressione delle IgG e i sottotipi istologici di carcinoma, dal momento che le cellule di carcinoma mammario scarsamente differenziate esprimono più IgG di quelle ben differenziate (Yang et al., 2013). Queste considerazioni supportano l'ipotesi che l'immunità umorale è coinvolta proprio nella progressione del tumore. Inoltre, un'altra considerazione che si potrebbe fare che i mastociti presenti, seppur poco rappresentati, possano essere direttamente reclutati e condizionati dalle stesse immunoglobuline.

Infatti, grandi quantità di IgG possono legare i mastociti e impedirne la degranolazione, poiché queste cellule, oltre a legare le IgE, esprimono anche recettori per la porzione Fc delle IgG. I mastociti possono quindi subire una modulazione anticorpale (Daëron, 2016). Groot et al. hanno dimostrato che le FLC (catene leggere prive di immunoglobuline) attivano i mastociti, con conseguente rilascio di molecole che inducono la crescita del tumore e hanno suggerito che l'aumento dell'espressione delle FLC è correlato a una scarsa sopravvivenza.

Per quanto riguarda i macrofagi, è stato sempre rilevato il tipo M1, per cui il loro ruolo è discutibile per le ragioni già indicate in precedenza. Tuttavia, un'altra possibile interpretazione potrebbe essere legata al ruolo che i macrofagi M1 svolgono nel portare alla formazione dei TLS. Infatti, le cellule M1 e i linfociti B possono sostituire le cellule induttrici del tessuto linfoide (cellule LTi), responsabili di innescare gli eventi che portano alla formazione dei TLS (Lochner et al., 2011; Guedj et al., 2014).

Riguardo al ruolo prognostico complessivo delle TLS, si possono trarre unicamente delle supposizioni poiché bisognerebbe valutare il follow-up dei soggetti i cui campioni sono stati analizzati. Tuttavia, in base alla maggiore rappresentanza delle TLS proprio nei tumori ad alto grado con un'organizzazione più definita proprio nelle aree a maggiore malignità, si potrebbe dire che, come già evidenziato nel tumore al seno da Sofopoulos et al., 2019, secondo cui le TLS sono indici prognostici sfavorevoli, anche nella cagna le strutture terziarie linfoidei potrebbero riflettere una prognosi peggiore.

Da quanto sopra esposto è chiaro che se i TLS sono il sito principale in cui avviene la risposta immunitaria antitumorale, è importante valutare il loro impatto sulla risposta al trattamento e la loro modulazione da parte delle terapie (Sautès-Fridman et al., 2019). In effetti, è stata considerata la possibilità di sviluppare strategie mirate alla neogenesi dei TLS nei tumori per consentire lo sviluppo di linfociti B e T memoria e garantire una difesa ottimale contro il tessuto neoplastico. Gli HEV che circondano i TLS permettono ai linfociti di entrare nel tumore; quindi, una strategia terapeutica potrebbe essere mirata a migliorare questa caratteristica (Carvalho et al., 2014).

Analizzando più da vicino l'impatto prognostico delle strutture terziarie nel carcinoma mammario, la presenza di TLS peritumorali è associata a tumori di grado 3 (Sofopoulos et al., 2019). La prognosi sfavorevole dipende sia dalla localizzazione dei TLS sia dalla loro densità. Nei tumori HER2+, si è visto che la presenza di TLS nel margine invasivo e/o peritumorale era correlata a una migliore sopravvivenza libera da malattia ma a una peggiore sopravvivenza globale, mentre questa differenza non è stata rilevata per i tumori HER2- (Liu et al., 2017).

Alcuni studi suggeriscono che i TLS associati all'infiammazione fungano da nicchie per le cellule progenitrici dei tumori e possano portare, ad esempio, a una recidiva del carcinoma epatocellulare. I TLS periferici possono quindi contribuire a

creare un ambiente immunosoppressivo, sostenendo la crescita del tumore attraverso effetti negativi sull'immunità antitumorale o positivi sulla neoplasia stessa (Finkin et al., 2015).

Alcuni studi suggeriscono che i TLS associati all'infiammazione fungano da nicchie per le cellule progenitrici del tumore e possano portare, ad esempio, a una recidiva del carcinoma epatocellulare. I TLS periferici possono quindi contribuire a creare un ambiente immunosoppressivo, sostenendo la crescita del tumore attraverso effetti negativi sull'immunità antitumorale o positivi sulla neoplasia stessa (Finkin et al., 2015).

Interessante, però, è stato il rinvenimento di un gruppo cellulare morfologicamente compatibile con una popolazione macrofagica di colore giallo bruno che all'immunoistochimica non presentava positività né per macrophage marker né per mast-cell tryptase. Si tratta di macrofagi ricchi in lipidi, già frequentemente evidenziati in altri contesti tumorali (Remmerie et al., 2018). Essi sono stati ricollegati alla progressione tumorale con un'origine che sembra strettamente connessa al decorrere della patologia e agli adattamenti metabolici consequenziali. Le ipotesi sul loro ruolo attualmente sono due. Secondo la prima potrebbero essere secondari ad un'aumentata attività fagocitaria ricollegata ai detriti necrotici che spesso accompagnano i tumori solidi. Un'altra possibilità è che i macrofagi ricchi in lipidi potrebbero essere una riserva energetica per il tumore nelle condizioni di ipossia (Murray et al., 2020). In base a quanto riscontrato, i macrofagi nei casi analizzati non sono stati rinvenuti in prossimità di necrosi; quindi, si, quindi effettivamente il loro ruolo potrebbe essere maggiormente legato proprio al sostentamento del tumore come fonte di energia soprattutto in circostanze che potrebbero risultare sfavorevoli per la crescita neoplastica.

Per ciò che concerne la positività ad Aven, questa risultava variabile in base all'area studiata, identificando una maggiore rappresentazione a livello epiteliale nelle zone a maggiore differenziazione a sostegno del suo ruolo come molecola antiapoptotica (Melzer et al., 2012).

I due cloni di EPO hanno dato, invece, risultati discordanti sottolineando una positività che si esplica a più livelli, da quello stromale (con EPOB4) a quello endoteliale ed epiteliale (con EPO7D10). Questa immunopositività non stupisce pensando al ruolo

promotore e angiogenico dell'eritropoietina nel tumore e, sebbene già si conoscesse una interazione tra EPO e mastociti, poco si conosce sull'espressione di EPO nei macrofagi. Il rapporto tra questi due elementi è stato riconosciuto nel rimaneggiamento e regolazione del midollo osseo (Eggold et al., 2019), mentre poco si sa riguardo ad una loro possibile interazione in ambito neoplastico lasciando quindi una dubbia interpretazione in cui non si può escludere un artefatto dell'anticorpo impiegato.

Non stupisce comunque la positività mastocitaria ad EPOR che avvalora ulteriormente quanto già dimostrato da uno studio di Sfacteria et al., 2011, confermando quindi un'interazione dell'eritropoietina che stimola la popolazione mastocitaria alla produzione di sostanze per il sostentamento tumorale. Ciò trova ulteriormente riprova nella positività di questi gruppi al Mast Cell-Tryptase, rimarcando quindi un coinvolgimento dei MC nei processi angiogenici.

Anche in questo caso però i macrofagi risultavano immunopositivi, facendo sorgere l'ipotesi secondo cui anche loro possano essere reclutati dall'eritropoietina ai fini della modulazione del microambiente tumorale.

Conclusioni

In conclusione, si comprende come il microambiente tumorale sia un'entità dinamica caratterizzata dal coinvolgimento di chemochine e popolazioni cellulari immunitarie che possono essere modulate dal tumore ai fini della sua stessa sopravvivenza e progressione. In generale, da quanto osservato, possiamo comunque affermare che anche nel tumore mammario canino si può parlare di strutture terziarie linfoidi con vari gradi di organizzazione. Il ruolo prognostico dei TLS nel cane, tuttavia, può essere solo ipotizzato, poiché sarebbe necessario un effettivo follow-up post-trattamento. Tuttavia, la loro maggiore rappresentazione negli istotipi più maligni suggerisce che i TLS potrebbero avere un valore prognostico negativo anche nel cane. Si tratta comunque di studi preliminari che dovranno sicuramente essere accompagnati da ulteriori verifiche e ricerche, ma che si pongono pienamente nel concetto di medicina traslazionale a maggior veduta se si considera che il tumore

mammario della cagna è stato da tempo considerato un modello per il tumore al seno della donna.

Tutto ciò inoltre apre la possibilità di individuare nuovi marker diagnostici e predittivi e persino, nuovi bersagli terapeutici.

Parte di questi risultati sono stati oggetto della seguente pubblicazione: Giambrone, G.*; Di Giorgio, S.*; Vullo, C.; Marino, G.; Puleio, R.; Mariotti, F.; Mazzullo, G.; Sfacteria, A. Does TLS Exist in Canine Mammary Gland Tumours? Preliminary Results in Simple Carcinomas. *Vet. Sci.* 2022, 9, 628 (*equal contribution).

VALUTAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE DEI TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES (TILS) E TERTIARY LYMPHOID STRUCTURES (TLS) NEI TUMORI MAMMARI DEL CANE

Materiali e metodi

Sono stati selezionati 50 casi di carcinoma mammario canino dal database dell'Unità di Patologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Messina e i campioni sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). Questi casi includevano neoplasie ottenute da mastectomia regionale o totale. Sezioni di 4 µm di spessore sono state tagliate da campioni FFPE e colorate di routine con ematossilina ed eosina (E-E). Le diagnosi di tumore sono state riviste secondo l'attuale classificazione istologica dei tumori mammari canini (Zappulli et al., 2019) e il grado di malignità secondo Peña et al., 2013.

Seguendo le linee guida per la valutazione dei TILs nel cancro del seno, proposte dall' International TILs Working Group 2014 (Salgado et al., 2015) e impiegando un microscopio Zeiss Axiophot con telecamera digitale (Zeiss) collegata a pc, è stata eseguita la valutazione da un singolo patologo.

Nella valutazione sono state incluse oltre alle aree stromali, anche le aree intratumorali e peritumorali; mentre sono state escluse le aree con eventuali artefatti o aree di necrosi. Di ogni area è stata scattata una foto a 5x di ingrandimento e di ogni campione sono state valutate non solo le aree con la più alta densità di infiltrato, ma le intere sezioni e tutto l'infiltrato infiammatorio sottoforma di TILs e TLSs al livello stromale (s) (dispersi nello stroma tra le cellule del carcinoma e non sono a contatto diretto con le carcinomatose), intratumorale (i) (presentano un contatto cellula-cellula senza interposizione di stroma e interagiscono direttamente con le cellule del carcinoma) e peritumorale (p) (distanza fino a 5 mm dal confine del tumore infiltrante - secondo le linee guida di Sofopoulos et al., 2019)(Figura 11).

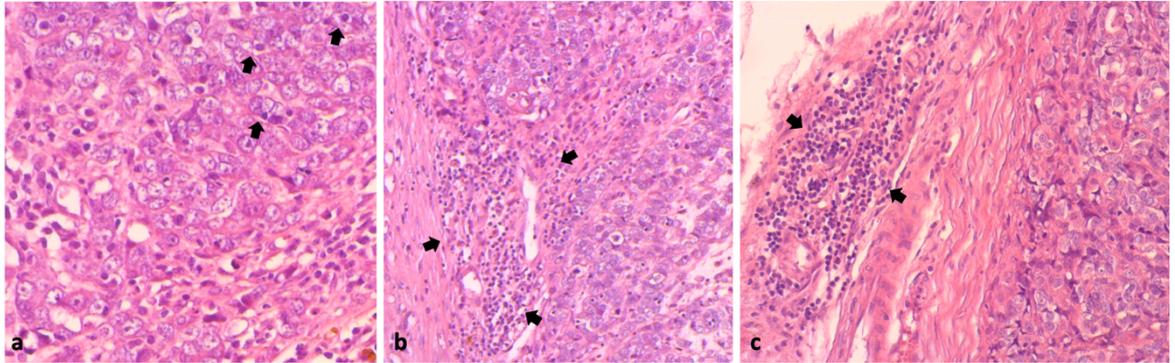


Figura 11. Infiltrato infiammatorio al livello intratumorale (a), stromale (b), peritumorale (c); (EE, 10x e 20x).

Pertanto, una volta identificati a maggiore ingrandimento la tipologia cellulare, per fare la distinzione tra TILs e TLSs (Figura 12), attraverso una valutazione semiquantitativa, è stata attribuita una percentuale di infiltrazione linfocitaria stromale/intratumorale/peritumorale valutando l'area occupata da cellule infiammatorie mononucleari sull'area corrispondente totale.

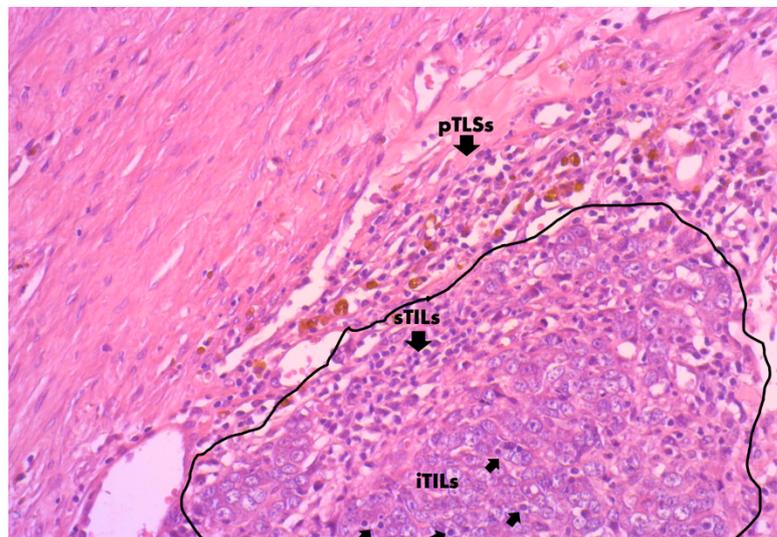


Figura 12. Identificazione tipologia cellulare TILs o TLSs al livello intratumorale, stromale e peritumorale (EE, 20x).

In base ai risultati ottenuti, gli infiltrati stromali/intratumorali/peritumorali sono stati suddivisi nelle seguenti tre categorie: bassa, 0-10% di TILs/TLs; intermedia, 11-40% di TILs/TLs; alta, 41-90% di TILs/TLs.

Risultati

Questo studio ha valutato 50 casi di carcinomi mammari canini, in soggetti tra i 5 e 15 anni di età. Le diagnosi istologiche includevano 16 carcinomi tubulopapillari semplici, 10 carcinoma tubulare semplice, 10 carcinoma solido, 12 carcinomi micropapillari invasivo, 2 carcinoma anaplastico. I tumori sono stati classificati come grado I in 14 casi, grado II in 24 casi e grado III in 12 casi.

Nello stesso tumore la distribuzione era spesso di più tipi. Nel complesso, gli infiltrati infiammatori erano più numerosi nelle aree stromali e peritumorali, rispetto a quelle intratumorali. Il 90% dei casi mostrava infiltrati a livello stromale, il 50 % li presentava a livello intratumorale e il 70% a livello peritumorale (Tabella 8). La quantificazione delle TILs/TLs secondo il punteggio di Salgado rivelava che 35 casi presentavano fino al 10% di TILs/TLs; 50 casi presentavano un infiltrato compreso tra 10- 40 % TILs/TLs; 20 casi presentavano più del 40% di TILs/TLs.

| | Stromali TILs/TLs n(%) | Intratumorali TILs/TLs n(%) | Peritumorali TIL/TLs n(%) |
|----------------------------|-------------------------------------|--|--|
| Basso (0-10%) | 5(55) | 15(60) | 15(43) |
| Intermedio (10-40%) | 30(67) | 10(40) | 10(29) |
| Alto (40-90%) | 10(22) | 0 | 10(29) |

Tabella 8. Valutazione percentuale di TILs/TLs al livello stromale, intratumorale e peritumorale dei carcinomi mammari semplici canini.

La distribuzione dei carcinomi paragonata al grado istologico (I, II, III) e al punteggio degli infiltrati (basso, intermedio e alto) e alle aree spaziali (stromale, intratumorale e periferico) è riassunta nella Tabella 9.

In tutti i diversi istotipi è emersa la presenza degli infiltrati e quest'ultimi erano più numerosi nei tumori con grado istologico II e III. Infatti, si presentavano nell' 80% dei casi con carcinomi di grado II e nel 90% dei casi con carcinoma di grado III. I carcinomi di grado I erano caratterizzati da una lieve infiltrazione di TILs/TLsS che risultava

| | Stromali TILs/TLsS n (%) | | | Intratumorali TILs/TLsS n (%) | | | Peritumorali TILs/TLsS n (%) | | |
|------------------|--------------------------------|--------|--------|-------------------------------------|--------|------|------------------------------------|--------|-------|
| | Basso | Inter. | Alto | Basso | Inter. | Alto | Basso | Inter. | Alto |
| | Grado I | 0 | 10(22) | 5(11) | 0 | 0 | 0 | 5(14) | 0 |
| Grado II | 0 | 10(22) | 5(11) | 10(40) | 54(20) | 0 | 5(14) | 0 | 5(14) |
| Grado III | 5(11) | 15(33) | 0 | 5(20) | 5(20) | 0 | 5(14) | 10(29) | 0 |

Tabella 9. Distribuzione dei carcinomi mammari semplici canini in relazione al grado (I, II, III), al punteggio TILs/TLsS (basso, intermedio e alto) e compartimenti tumorali (stromali, intratumorali e peritumorali).

assente soprattutto al livello intratumorale, mentre i carcinomi di grado II e III erano associati a una moderata e/o marcata infiltrazione di TILs/TLsS.

Un aumento delle TILs/TLsS stromali e soprattutto peritumorali era significativamente associato a carcinomi di alto grado, nei quali le cellule di tipo linfoide assumevano un andamento concentrico intorno ai vasi contenenti, nella maggior parte dei casi, emboli neoplastici. Inoltre, la distribuzione dell'infiltrato nelle aree stromali e peritumorali si presentava in modo uniforme e appariva sia con aspetto di bande che come aggregati più cospicui; mentre al livello intratumorale la distribuzione degli infiltrati non era uniforme.

L'analisi immunoistochimica confermava che i TILs/TLSs erano per la maggior parte linfociti T (CD3-positivi) ed erano numerosi anche i macrofagi (macrophage marker positivi) che erano distribuiti soprattutto al livello stromale e peritumorale. La valutazione semiquantitativa delle TILs/TLSs ha confermato la presenza di una popolazione mista di linfociti con una netta prevalenza di cellule CD3+ nella maggior parte dei tumori soprattutto distribuiti nelle aree stromali e peritumorali.

Discussioni e conclusioni

I nostri risultati, seppur limitati per quanto riguarda il loro valore prognostico e statistico, mostrano che il metodo proposto da Salgado et al. può essere agevolmente applicato per quantificare e valutare la distribuzione dei TILs/TLSs nei tumori mammari canini. Inoltre, seguendo le linee guida proposte dal gruppo di lavoro sulle TIL (Salgado et al., 2015), abbiamo valutato non solo le TILs/TLSs stromali, note per il valore predittivo nelle donne, ma anche quelle intratumorali e peritumorali.

Gli infiltrati emersi, rappresentano strutture di varia organizzazione (TILs/TLSs), da semplici ammassi di linfociti a strutture complicate con notevoli somiglianze morfologiche, cellulari e molecolari con gli SLO, in particolare con i linfonodi. I TILs/TLSs sono stati rilevati maggiormente al livello stromale e peritumorale e la loro densità è stata per lo più correlata a tumori con un grado più elevato (II, III), in accordo con altri studi in medicina umana sia sul tumore al seno e sul carcinoma uroteliale della vescica (Liu et al., 2017; Koti et al., 2017; Sofopoulos et al., 2019). Gli infiltrati intratumorali ritrovati in minore quantità, erano costituiti prevalentemente da TILs; mentre nei pochi casi dove si riscontravano le TILs insieme con le TLS al livello intratumorale, sicuramente la presenza di quest'ultimi era collegata ad un potenziamento dell'efficacia dei TIL e quindi responsabili di una risposta immunitaria antitumorale locale, come anche confermato in medicina umana da Colbeck et al., 2017 e Goc et al., 2014.

Riassumendo, nel presente studio, abbiamo analizzato la presenza, la quantità e la distribuzione dei TILs/TLS al livello stromale, intratumorale e peritumorale, da soli e in combinazione con il grado istologico. Questo tipo di analisi ha fornito informazioni significative sulla distribuzione degli infiltrati in base al grado istologico. Inoltre, ha

permesso di quantificare quest'ultimi secondo il metodo proposto da Salgado et al., 2015 e di applicarlo anche per la valutazione degli infiltrati intratumorali e peritumorali. Le nostre osservazioni supportano l'esistenza di un'interazione dinamica tra le cellule immunitarie del microambiente stromale con la controparte peritumorale. Infine, alla luce dei risultati ottenuti, la presenza e la densità dei TILs /TLSs stromali e peritumorali in istotipi a maggiore malignità, sembrerebbero confermare che nel cane abbiano un valore prognostico negativo.

Ulteriori studi, accompagnati da altre ricerche sono necessari per conoscere a fondo il loro ruolo.

BIBLIOGRAFIA

Adega F, Borges A, Chaves R. Cat Mammary Tumors: Genetic Models for the Human Counterpart. *Vet Sci.* 2016; 3:17. doi: 10.3390/vetsci3030017.

Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, Earl HM, Poole CJ, Hiller L, Dunn JA, Bowden SJ, Twelves C, Bartlett JM, Mahmoud SM, Rakha E, Ellis IO, Liu S, Gao D, Nielsen TO, Pharoah PD, Caldas C. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol.* 2014; 25:1536-43. doi: 10.1093/annonc/mdu191.

Allen HL. Feline mammary hypertrophy. *Vet. Pathol.* 1973; 10: 501-508.

Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:205-17. doi: 10.1038/nri1786.

Alter NM. Mechanical Irritation as Etiologic Factor of Cancer: Clinical Observation. *Am J Pathol.* 1925; 1:511-518.

Ariyaratna H, Thomson N, Aberdein D, Munday JS. Low Stromal Mast Cell Density in Canine Mammary Gland Tumours Predicts a Poor Prognosis. *J Comp Pathol.* 2020; 175:29-38. doi: 10.1016/j.jcpa.2019.12.004.

Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Kurata K, Noda S, Takashima T, Onoda N, Tanaka S, Ohsawa M, Hirakawa K. Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. *Br J Surg.* 2016; 103:845-54. doi: 10.1002/bjs.10127.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005; 7:211-7. doi: 10.1016/j.ccr.2005.02.013.

Barbera-Guillem E, May KF Jr, Nyhus JK, Nelson MB. Promotion of tumor invasion by cooperation of granulocytes and macrophages activated by anti-tumor antibodies. *Neoplasia*. 1999; 1:453-60. doi: 10.1038/sj.neo.7900054.

Bassani B, Baci D, Gallazzi M, Poggi A, Bruno A, Mortara L. Natural Killer Cells as Key Players of Tumor Progression and Angiogenesis: Old and Novel Tools to Divert Their Pro-Tumor Activities into Potent Anti-Tumor Effects. *Cancers (Basel)*. 2019; 11:461. doi: 10.3390/cancers11040461.

Benoy IH, Salgado R, Van Dam P, Geboers K, Van Marck E, Scharpé S, Vermeulen PB, Dirix LY. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:7157-62. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0812.

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*. 2002; 196:254-65. doi: 10.1002/path.1027.

Brien G, Trescol-Biemont MC, Bonnefoy-Bérard N. Downregulation of Bfl-1 protein expression sensitizes malignant B cells to apoptosis. *Oncogene*. 2007; 26:5828-32. doi: 10.1038/sj.onc.1210363.

Brunetti B, Beha G, Benazzi C, Bondin V, De Tolla L, Sarli G. CD117 expression influences proliferation but not survival in canine mammary tumours. *J Comp Pathol*. 2014; 151:202-6. doi: 10.1016/j.jcpa.2014.04.018.

Bulun SE, Chen D, Moy I, Brooks DC, Zhao H. Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction. *Trends Endocrinol Metab*. 2012; 23:83-9. doi: 10.1016/j.tem.2011.10.003.

Burstyn, U. Management of mastitis and abscessation of mammary glands secondary to fibroadenomatous hyperplasia in a primiparturient cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2010; 236: 326–329.

Byun JS, Gardner K. Wounds that will not heal: pervasive cellular reprogramming in cancer. *Am J Pathol.* 2013; 182:1055-64. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.009.

Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL. A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:130894. doi: 10.1155/2014/130894.

Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL. T-lymphocytic infiltrate in canine mammary tumours: clinic and prognostic implications. *In Vivo.* 2011 Nov-Dec;25(6):963-9.

Carvalho MI, Pires I, Dias M, Prada J, Gregório H, Lobo L, Queiroga F. Intratumoral CD3+ T-lymphocytes immunoexpression and its association with c-Kit, angiogenesis, and overall survival in malignant canine mammary tumors. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2015; 2015:920409. doi: 10.1155/2015/920409.

Castagnaro M, Casalone C, Bozzetta E, De Maria R, Biolatti B, Caramelli M. Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *J Comp Pathol.* 1998 Oct;119(3):263-75. doi: 10.1016/s0021-9975(98)80049-2.

Catacchio I, Silvestris N, Scarpi E, Schirosi L, Scattone A, Mangia A. Intratumoral, rather than stromal, CD8+ T cells could be a potential negative prognostic marker in invasive breast cancer patients. *Transl. Oncol.* 2019; 12: 585–595.

Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2005; 227:1625–9. doi: 10.2460/javma.2005.227.1625.

Chau BN, Cheng EH, Kerr DA, Hardwick JM. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell*. 2000; 6:31- 40.

Chocteau F, Boulay M-M, Besnard F, Valeau G, Loussouarn D and Nguyen F. Proposal for a Histological Staging System of Mammary Carcinomas in Dogs and Cats. Part 2: Feline Mammary Carcinomas. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6:387. doi: 10.3389/fvets.2019.00387.

Chui X, Egami H, Yamashita J, Kurizaki T, Ohmachi H, Yamamoto S, Ogawa M. Immunohistochemical expression of the c-kit proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br J Cancer*. 1996; 73:1233-6. doi: 10.1038/bjc.1996.236.

Clemente M, De Andres PJ, Peña L, Perez-Alenza MD. Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *Vet Rec*. 2009; 165:78–81. doi: 10.1136/vetrec.165.3.78.

Colbeck EJ, Ager A, Gallimore A, Jones GW. Tertiary Lymphoid Structures in Cancer: Drivers of Antitumor Immunity, Immunosuppression, or Bystander Sentinels in Disease? *Front Immunol*. 2017; 8:1830. doi: 10.3389/fimmu.2017.01830.

Coronella JA, Spier C, Welch M, Trevor KT, Stopeck AT, Villar H, Hersh EM. Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J Immunol*. 2002; 169:1829-36. doi: 10.4049/jimmunol.169.4.1829.

Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol*. 2001; 70:478-90.

Dagher E, Simbault L, Abadie J, Loussouarn D, Campone M, Nguyen F. Identification of an immune-suppressed subtype of feline triple-negative basal-like invasive mammary

carcinomas, spontaneous models of breast cancer. *Tumour Biol.* 2020; 42:1010428319901052. doi: 10.1177/1010428319901052.

Daëron, M. Innate myeloid cells under the control of adaptive immunity: The example of mast cells and basophils. *Curr. Opin. Immunol.* 2016; 38: 101–108.

Dawson TM. Preconditioning-mediated neuroprotection through erythropoietin? *Lancet.* 2002; 359(9301):96-7. doi: 10.1016/S0140- 6736(02)07335-X. Erratum in: *Lancet* 2002; 359(9319):1782.

De Andrés PJ, Illera JC, Cáceres S, Díez L, Pérez-Alenza MD, Peña L. Increased levels of interleukins 8 and 10 as findings of canine inflammatory mammary cancer. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013; 152:245-51. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.12.010.

de Melo, E.H., Câmara, D.R., Notomi, M.K., Jabour, F.F., Garrido, R.A., Nogueira, A.C., Júnior, J.C. and de Souza, F.W. Effectiveness of ovariohysterectomy on feline mammary fibroepithelial hyperplasia treatment. *J. Feline Med. Surg.* 2021; 23: 351–356.

Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Törne C, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Dietel M, von Minckwitz G. Tumor- associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28:105-13. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7370. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2010 Feb 1;28(4):708.

Di Caro G, Bergomas F, Grizzi F, Doni A, Bianchi P, Malesci A, Laghi L, Allavena P, Mantovani A, Marchesi F. Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 2014; 20:2147- 58. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2590.

Dieci MV, Miglietta F, Guarneri V. Immune Infiltrates in Breast Cancer: Recent Updates and Clinical Implications. *Cells,* 2021; 10: 223.

Dieu-Nosjean MC, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol Rev.* 2016; 271:260-75. doi: 10.1111/imr.12405.

Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst.* 1968; 40:307-18.

Drudi, D., Tinto, D., Ferranti, D., Fiorelli, F., Dal Pozzo, M. and Capitani, O. Aloe barbadensis miller versus silver sulfadiazine creams for wound healing by secondary intention in dogs and cats: a randomized controlled study. *Res. Vet. Sci.* 2018; 117: 1-9.

Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986; 315:1650-9. doi: 10.1056/NEJM198612253152606.

Dvorak AM. *Blood Cell Biochemistry. Volume 4: Basophil and Mast Cell Degranulation and Recovery*; Springer New York, NY, USA, 1991.

Dvorak HF. Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol.* 2003; 162:1747-57. doi:10.1016/s0002-9440(10)64309-x.

Dvorak H. F. Reconciling VEGF With VPF: The Importance of Increased Vascular Permeability for Stroma Formation in Tumors, Healing Wounds, and Chronic Inflammation. *Front Cell Dev Biol.* 2021; doi:10.3389/fcell.2021.660609.

Dyduch G, Kaczmarczyk K, Okoń K. Mast cells and cancer: enemies or allies? *Pol J Pathol.* 2012; 63:1-7.

Egenvall A, Bonnett BN, Häggström J, Ström Holst B, Möller L, Nødtvedt A. Morbidity of insured Swedish cats during 1999-2006 by age, breed, sex, and diagnosis. *J Feline Med Surg*. 2010; 12:948-59. doi:10.1016/j.jfms.2010.08.008.

Eggold JT, Rankin EB. Erythropoiesis, EPO, macrophages, and bone. *Bone*. 2019; 119:36-41. doi: 10.1016/j.bone.2018.03.014.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991; 19:403-10. doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.

Engelhard VH, Rodriguez AB, Mauldin IS, Woods AN, Peske JD, Slingluff CL Jr. Immune Cell Infiltration and Tertiary Lymphoid Structures as Determinants of Antitumor Immunity. *J Immunol*. 2018; 200:432-442. doi: 10.4049/jimmunol.1701269.

Enginler SO, Akış I, Toydemir TS, Oztapak K, Haktanir D, Gündüz MC, Kırşan I, Fırat I. Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. *Vet Res Commun*. 2014; 38:21-7. doi: 10.1007/s11259-013-9577-7.

Estrela-Lima A, Araújo MS, Costa-Neto JM, Teixeira-Carvalho A, Barrouin-Melo SM, Cardoso SV, Martins-Filho OA, Serakides R, Cassali GD. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*. 2010; 10:256. doi: 10.1186/1471-2407-10-256.

Fieni, F., Martal, J., Marnet, P.G., Siliart, B. and Guittot, F. Clinical, biological and hormonal study of mid-pregnancy termination in cats with aglepristone. *Theriogenology*. 2006; 66:1721-1728.

Figenschau SL, Fismen S, Fenton KA, Fenton C, Mortensen ES. Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2015; 15:101. doi: 10.1186/s12885-015-1116-1.

Figenschau SL, Knutsen E, Urbarova I, Fenton C, Elston B, Perander M, Mortensen ES, Fenton KA. ICAM1 expression is induced by proinflammatory cytokines and associated with TLS formation in aggressive breast cancer subtypes. *Sci Rep*. 2018; 8:11720. doi: 10.1038/s41598-018-29604-2.

Finkin S, Yuan D, Stein I, Taniguchi K, Weber A, Unger K, Browning JL, Goossens N, Nakagawa S, Gunasekaran G, Schwartz ME, Kobayashi M, Kumada H, Berger M, Pappo O, Rajewsky K, Hoshida Y, Karin M, Heikenwalder M, Ben-Neriah Y, Pikarsky E. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol*. 2015; 16:1235-44. doi: 10.1038/ni.3290.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971; 285:1182-6. doi: 10.1056/NEJM197111182852108.

Fortis SP, Sofopoulos M, Sotiriadou NN, Haritos C, Vaxevanis CK, Anastasopoulou EA, Janssen N, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Pawelec G, Perez SA, Baxevanis CN. Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2017; 5:39. doi: 10.1186/s40425-017-0240-7.

Furtado GC, Marinkovic T, Martin AP, Garin A, Hoch B, Hubner W, Chen BK, Genden E, Skobe M, Lira SA. Lymphotoxin beta receptor signaling is required for inflammatory lymphangiogenesis in the thyroid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:5026-31. doi: 10.1073/pnas.0606697104.

Galli SJ, Tsai M. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci*. 2008; 49:7-19. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.09.009.

Ganeshan K, Bryce PJ. Regulatory T cells enhance mast cell production of IL-6 via surface-bound TGF- β . *J Immunol.* 2012; 188:594-603. doi: 10.4049/jimmunol.1102389.

Garcia M, Platet N, Liaudet E, Laurent V, Derocq D, Brouillet JP, Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells.* 1996; 14:642-50. doi: 10.1002/stem.140642.

Gelaleti GB, Jardim BV, Leonel C, Moschetta MG, Zuccari DA. Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012; 146:106-12. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.02.005.

Georgiev P, Wehrend A. Mid-gestation pregnancy termination by the progesterone antagonist aglepristone in queens. *Theriogenology.* 2006; 65: 1401-1406.

Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation.* 2004; 110:1564-71. doi: 10.1161/01.CIR.0000142055.53122.FA.

Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TK, Lupo A, Klein C, Knockaert S, de Chaisemartin L, Ouakrim H, Becht E, Alifano M, Validire P, Remark R, Hammond SA, Cremer I, Damotte D, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res.* 2014; 74:705-15. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1342.

Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13:871-82. doi: 10.1038/nrc3627.

Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*. 1988; 242:1412-5. doi: 10.1126/science.2849206.

Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011; 48:117–31. doi: 10.1177/0300985810393258.

Goldschmidt MH, Peña L, Zappulli V. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ, editor. *Tumors in Domestic Animals*. Fifth ed. Danvers, MA: John Wiley & Sons, Inc (2017). p. 723-65. doi: 10.1002/9781119181200.ch17.

Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010; 32:593-604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.

Görlinger S, Kooistra HS, van den Broek A, Okkens AC. Treatment of fibroadenomatous hyperplasia in cats with aglepristone. *J. Vet. Intern. Med*. 2002; 16: 710–713.

Groot Kormelink, T.; Powe, D.G.; Kuijpers, S.A.; Abudukelimu, A.; Fens, M.H.; Pieters, E.H.; Kassing van der Ven, W.W.; Habashy, H.O.; Ellis, I.O.; Blokhuis, B.R.; et al. Immunoglobulin free light chains are biomarkers of poor prognosis in basal-like breast cancer and are potential targets in tumor-associated inflammation. *Oncotarget*. 2014; 5:3159–3167.

Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, Ravoet M, Le Buanec H, Sibille C, Manfouo-Foutsop G, Veys I, Haibe-Kains B, Singhal SK, Michiels S, Rothé F, Salgado R, Duvillier H, Ignatiadis M, Desmedt C, Bron D, Larsimont D, Piccart M, Sotiriou C, Willard-Gallo K. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*. 2013; 123:2873-92. doi: 10.1172/JCI67428.

Guedj, K.; Khallou-Laschet, J.; Clement, M.; Morvan, M.; Gaston, A.T.; Fornasa, G.; Dai, J.; Gervais-Taurel, M.; Eberl, G.; Michel, J.B.; et al. M1 macrophages act as LT β R-

independent lymphoid tissue inducer cells during atherosclerosis-related lymphoid neogenesis. *Cardiovasc. Res.* 2014; 101: 434–443.

Gwak JM, Jang MH, Kim DI, Seo AN, Park SY. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. *PLoS One.* 2015; 10:e0125728. doi: 10.1371/journal.pone.0125728.

Haddow A. Molecular repair, wound healing, and carcinogenesis: tumor production a possible overhealing? *Adv Cancer Res.* 1972; 16:181-234. doi: 10.1016/s0065-230x(08)60341-3.

Haga S, Nakayama M, Tatsumi K, Maeda M, Imai S, Umesako S, et al. Overexpression of the p53 gene product in canine mammary tumors. *Oncol Rep.* 2001; 8:1215–19. doi: 10.3892/or.8.6.1215.

Harbeck N, Penault-llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2019; 5:66. doi: 10.1038/s41572-019-0111-2.

Hayden DW, Barnes DM, Johnson KH. Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats: a retrospective study. *Vet. Pathol.* 1989; 26: 104–113.

Hayes HM Jr., Milne KL, Mandell CP. Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *Vet Rec.* 1981; 108: 476–9. doi: 10.1136/vr.108.22.476.

Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PI, Sanders M, Solomon B, Solinas C, Van den Eynden GGGM, Allory Y, Preusser M, Hainfellner J, Pruneri G, Vingiani A, Demaria S, Symmans F, Nuciforo P, Comerma L, Thompson EA, Lakhani S, Kim SR, Schnitt S, Colpaert C, Sotiropoulos C, Scherer SJ, Ignatiadis M, Badve S, Pierce RH, Viale G, Sirtaine N, Penault-llorca F, Sugie T, Fineberg S, Paik S, Srinivasan A, Richardson A, Wang Y, Chmielik E, Brock J, Johnson DB, Balko J, Wienert S, Bossuyt V, Michiels S, Ternes N, Burchardi N,

Luen SJ, Savas P, Klauschen F, Watson PH, Nelson BH, Criscitiello C, O'Toole S, Larsimont D, de Wind R, Curigliano G, André F, Lacroix-Triki M, van de Vijver M, Rojo F, Floris G, Bedri S, Sparano J, Rimm D, Nielsen T, Kos Z, Hewitt S, Singh B, Farshid G, Loibl S, Allison KH, Tung N, Adams S, Willard-Gallo K, Horlings HM, Gandhi L, Moreira A, Hirsch F, Dieci MV, Urbanowicz M, Brcic I, Korski K, Gaire F, Koeppen H, Lo A, Giltneane J, Rebelatto MC, Steele KE, Zha J, Emancipator K, Juco JW, Denkert C, Reis-Filho J, Loi S, Fox SB. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol.* 2017; 24:235-251. doi: 10.1097/PAP.000000000000162.

Hill DG, Yu L, Gao H, Balic JJ, West A, Oshima H, McLeod L, Oshima M, Gallimore A, D'Costa K, Bhathal PS, Sievert W, Ferrero RL, Jenkins BJ, Jones GW. Hyperactive gp130/STAT3-driven gastric tumourigenesis promotes submucosal tertiary lymphoid structure development. *Int J Cancer.* 2018; 143:167-178. doi: 10.1002/ijc.31298.

Huang J, Zhang L, Ma T, Zhang P, Qiu X. Expression of immunoglobulin gene with classical V-(D)-J rearrangement in mouse testis and epididymis. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57:339-49. doi: 10.1369/jhc.2008.951434.

Hughes K, Dobson JM. Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. *Vet J.* 2012; 194:19–26.

Hussein MR, Hassan HI. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. *J Clin Pathol.* 2006; 59:972-7. doi: 10.1136/jcp.2005.031252.

Iglesia MD, Vincent BG, Parker JS, Hoadley KA, Carey LA, Perou CM, Serody JS. Prognostic B-cell signatures using mRNA-seq in patients with subtype-specific breast

and ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2014; 20:3818-29. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3368.

Ihle JN, Witthuhn B, Tang B, Yi T, Quelle FW. Cytokine receptors and signal transduction. *Baillieres Clin Haematol.* 1994; 7:17-48. doi: 10.1016/s0950-3536(05)80005-8. PMID: 7518712.

Im KS, Kim JH, Yhee JY, Yu CH, Kim NH, Nho WG, Sur JH. Tryptase- positive mast cells correlate with angiogenesis in canine mammary carcinoma. *J Comp Pathol.* 2011; 144:157-63. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.08.006.

Isogai R, Takahashi M, Aisu K, Horiuti Y, Aragane Y, Kawada A, Tezuka T. The receptor for erythropoietin is present on cutaneous mast cells. *Arch Dermatol Res.* 2006; 297:389-94. doi: 10.1007/s00403-005-0615- 3.

Jemal A, Murray T, Samuels A, et al. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin.* 2003; 53:5–26.

Jing Z, Deng H, Ma J, Guo Y, Liang Y, Wu R, A L, Geng Z, Qiu X, Wang Y. Expression of immunoglobulin G in human podocytes, and its role in cell viability and adhesion. *Int J Mol Med.* 2018; 41:3296-3306. doi: 10.3892/ijmm.2018.3525.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104. Erratum in: *J Clin Invest.* 2010; 120:1786.

Kamradt T. Immunological tolerance. In: Male, D., Brostoff, J., Roth, D., Roitt 1. (Eds), *Immunology.* Eighth Ed. Elsevier, St. Louis, MO, USA, 2012, pp. 307-321.

Kashiwase Y, Morioka J, Inamura H, Yoshizawa Y, Usui R, Kurosawa M. Quantitative analysis of mast cells in benign and malignant breast lesions. *Immunohistochemical*

study on formalin-fixed, paraffin- embedded tissues. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004; 134:199-205. doi: 10.1159/000078766.

Kaszak I, Ruszczak A, Kanafa S, Kacprzak K, Król M, Jurka P. Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Vet Scand.* 2018; 60:66. doi: 10.1186/s13028-018-0417-1.

Kim JH, Hur JH, Lee SM, Im KS, Kim NH, Sur JH. Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. *Vet J.* 2012; 193:222-7. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.10.022.

Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol.* 2009; 174:1588-93. doi: 10.2353/ajpath.2009.080545.

Koti M, Xu AS, Ren KYM, Visram K, Ren R, Berman DM, Siemens DR. Tertiary Lymphoid Structures Associate with Tumour Stage in Urothelial Bladder Cancer. *Bladder Cancer.* 2017; 3:259-267. doi: 10.3233/BLC-170120.

Kutuk O, Temel SG, Tolunay S, Basaga H. Aven blocks DNA damage- induced apoptosis by stabilising Bcl-xL. *Eur J Cancer.* 2010; 46:2494-505. doi: 10.1016/j.ejca.2010.06.011.

Largeot A, Pagano G, Gonder S, Moussay E, Paggetti J. The B-side of Cancer Immunity: The Underrated Tune. *Cells.* 2019; 8:449. doi: 10.3390/cells8050449.

Lee M, Heo SH, Song IH, Rajayi H, Park HS, Park IA, Kim YA, Lee H, Gong G, Lee HJ. Presence of tertiary lymphoid structures determines the level of tumor-infiltrating lymphocytes in primary breast cancer and metastasis. *Mod Pathol.* 2019; 32:70-80. doi: 10.1038/s41379-018- 0113-8.

Leyland-Jones B; BEST Investigators and Study Group. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol.* 2003; 4:459-60. doi: 10.1016/s1470-2045(03)01163-x.

Li Y, Miao W, He D, Wang S, Lou J, Jiang Y, Wang S. Recent Progress on Immunotherapy for Breast Cancer: Tumor Microenvironment, Nanotechnology and More. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021; 9:680315. doi: 10.3389/fbioe.2021.680315.

Lim HY, Im KS, Kim NH, Kim HW, Shin JI, Sur JH. Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. *Vet J.* 2015; 203:326-31. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.01.005.

Liu X, Tsang JYS, Hlaing T, Hu J, Ni YB, Chan SK, Cheung SY, Tse GM. Distinct Tertiary Lymphoid Structure Associations and Their Prognostic Relevance in HER2 Positive and Negative Breast Cancers. *Oncologist* 2017; 22:1316–1324.

Lochner M, Ohnmacht C, Presley L, Bruhns P, Si-Tahar M, Sawa S, Eberl G. Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of RORgamma t and LTi cells. *J. Exp. Med.* 2011; 208:125–134.

Lokuhetty D, White V, Watanabe R, Cree I. WHO Classification of Tumours. Breast Tumors. 5 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2019.

Loretti AP, Ilha MRS, Breitsameter I, Faraco CS. Clinical and pathological study of feline mammary fibroadenomatous change associated with depot medroxyprogesterone acetate therapy. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2004; 56: 270–274.

Lucchesi D, Bombardieri M. The role of viruses in autoreactive B cell activation within tertiary lymphoid structures in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2013; 94:1191-9. doi: 10.1189/jlb.0413240.

Luo Y, Zhou H, Krueger J, Kaplan C, Lee SH, Dolman C, Markowitz D, Wu W, Liu C, Reisfeld RA, Xiang R. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J Clin Invest.* 2006; 116:2132-2141. doi: 10.1172/JCI27648.

Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyadi J, Matloubian M, Cyster JG. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol.* 2002; 169:424-33. doi: 10.4049/jimmunol.169.1.424.

MacKay D, Miller AL. Nutritional support for wound healing. *Altern. Med. Rev.* 2003; 8:359-377.

Malmberg KJ, Carlsten M, Björklund A, Sohlberg E, Bryceson YT, Ljunggren HG. Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. *Semin Immunol.* 2017; 31:20-29. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.002.

Mantovani A, Locati M. Orchestration of macrophage polarization. *Blood.* 2009; 114:3135-6. doi: 10.1182/blood-2009-07-231795.

Marconato L, Del Piero F. *Oncologia medica dei piccoli animali*, (2005). Polletto Editore.

Marconato L, Romanelli G, Stefanello D, Giacoboni C, Bonfanti U, Bettini G, et al. Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). *J Am Vet Med Assoc.* 2009; 235:967-72. doi: 10.2460/javma.235.8.967.

Martín De Las Mulas J, Millán Y, Bautista MJ, Pérez J, Carrasco L. Oestrogen and progesterone receptors in feline fibroadenomatous change: an immunohistochemical study. *Res. Vet. Sci.* 2000; 68: 15-21.

Martinet L, Garrido I, Filleron T, Le Guellec S, Bellard E, Fournie JJ, Rochaix P, Girard JP. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-

lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 2011; 71:5678-87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0431.

Martinet L, Le Guellec S, Filleron T, Lamant L, Meyer N, Rochaix P, Garrido I, Girard JP. High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions: Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology.* 2012; 1:829-839. doi: 10.4161/onci.20492.

McGavin, D.M., Zachary, J.F., Brachelente, C., Lepri, E., Sforza, M., *Patologia generale veterinaria*, Editore Elsevier, 2008, pp. 28-32.

McKay DG. Participation of components of the blood coagulation system in the inflammatory response. *Am J Pathol.* 1972; 67:181-210.

Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* 2012; 12:306.

Meier D, Bornmann C, Chappaz S, Schmutz S, Otten LA, Ceredig R, Acha-Orbea H, Finke D. Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity.* 2007; 26:643-54. doi: 10.1016/j.immuni.2007.04.009.

Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* 2011; 480:480-9. doi: 10.1038/nature10673.

Melzer IM, Fernández SB, Bösser S, Lohrig K, Lewandrowski U, Wolters D, Kehrlöesser S, Brezniceanu ML, Theos AC, Irusta PM, Impens F, Gevaert K, Zörnig M. The Apaf-1-binding protein Aven is cleaved by Cathepsin D to unleash its anti-apoptotic potential. *Cell Death Differ.* 2012 ; 19:1435-45. doi: 10.1038/cdd.2012.17.

Meuten DJ, Moore FM, George JW. Mitotic Count and the Field of View Area: Time to Standardize. *VetPathol.* 2016; 53:7-9.

Miller CH, Rice AS, Garrett K, Stein SF. Gender, race and diet affect platelet function tests in normal subjects, contributing to a high rate of abnormal results. *Br J Haematol* 2014; 165:842-53.

Mills SW, Musil KM, Davies JL, et al. Prognostic Value of Histologic Grading for Feline Mammary Carcinoma: A Retrospective Survival Analysis. *Veterinary Pathology.* 2015; 52:238-249. doi:10.1177/0300985814543198.

Misdorp W. Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1991; 125(suppl 1):27-31.

Misdorp W, Else RW, Hellme'n E, et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In: World Health Organization, ed. *International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second ser. Vol 7.* Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology; 1999: 11-56.

Misdorp W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals.* Ames, Iowa: Iowa State Press; (2008), pp 575-606.

Mkaouar L, Endo Y, Jun HX, Lee SJ, Jaroensong T, Mochizuki M, Uchida K, Nakayama H, Sasaki N, Nakagawa T. Relationship between NF- κ B expression and malignancy of canine mammary gland tumor tissues. *J Vet Med Sci.* 2012; 74:713-8. doi: 10.1292/jvms.11-0380.

Moe L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl.* 2001; 57:439-43.

Mol, J.A., van Garderen, E., Rutteman, G.R. and Rijnberk, A. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium:

induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1996; 57: 67–71.

Monteiro LN, Dos Reis DC, Salgado BS, Cassali GD. Clinical significance and prognostic role of tumor-associated macrophages infiltration according to histologic location in canine mammary carcinomas. *Res Vet Sci.* 2021; 135:329-334. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.10.010.

Monteiro LN, Rodrigues MA, Gomes DA, Salgado BS, Cassali GD. Tumour-associated macrophages: Relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. *Vet J.* 2018; 234:119-125. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.02.016.

Montfort A, Pearce O, Maniati E, Vincent BG, Bixby L, Böhm S, Dowe T, Wilkes EH, Chakravarty P, Thompson R, Topping J, Cutillas PR, Lockley M, Serody JS, Capasso M, Balkwill FR. A Strong B-cell Response Is Part of the Immune Landscape in Human High-Grade Serous Ovarian Metastases. *Clin Cancer Res.* 2017; 23:250-262. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0081.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:958-69. doi: 10.1038/nri2448.

Mukhtar RA, Nseyo O, Campbell MJ, Esserman LJ. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011; 11:91-100. doi: 10.1586/erm.10.97.

Murray PJ. Cancer metastasis linked to macrophage size, shape, and metabolism. *J Exp Med.* 2020; 217:e20201259. doi: 10.1084/jem.20201259.

Muscatello LV, Avallone G, Brunetti B, Bacci B, Foschini MP, Sarli G. Standardized approach for evaluating tumor infiltrating lymphocytes in canine mammary

carcinoma: Spatial distribution and score as relevant features of tumor malignancy. *Vet J.* 2022; 283-284:105833. doi: 10.1016/j.tvjl.2022.105833.

Nascimento C, Ferreira F. Tumor microenvironment of human breast cancer, and feline mammary carcinoma as a potential study model. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2021; 1876: 188587.

Nascimento C, Gameiro A, Correia J, Ferreira J, Ferreira F. The Landscape of Tumor-Infiltrating Immune Cells in Feline Mammary Carcinoma: Pathological and Clinical Implications. *Cells.* 2022; 11:2578. doi: 10.3390/cells11162578.

Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5:297-309. doi: 10.1038/nrc1588.

Nerviani A, Pitzalis C. Role of chemokines in ectopic lymphoid structures formation in autoimmunity and cancer. *J Leukoc Biol.* 2018; 104:333-341. doi: 10.1002/JLB.3MR0218-062R.

Nielsen SW. The malignancy of mammary tumors in cats. *Mod Vet Pract.* 1967; 33:245-252.

Nienartowicz A, Sobaniec-Łotowska ME, Jarocka-Cyrta E, Lemancewicz D. Mast cells in neoangiogenesis. *Med Sci Monit.* 2006; 12:RA53- 6.

Nieto MA, Cano A. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol.* 2012; 22:361-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.05.003.

Oldford SA, Marshall JS. Mast cells as targets for immunotherapy of solid tumors. *Mol Immunol.* 2015; 63:113-24. doi: 10.1016/j.molimm.2014.02.020.

Olopade OI, Adeyanju MO, Safa AR, Hagos F, Mick R, Thompson CB, Recant WM. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am*. 1997; 3:230-7.

Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, Dohi T. Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J Cancer*. 2006; 118:2232-6. doi: 10.1002/ijc.21639.

Otranto M, Sarrazy V, Bonté F, Hinz B, Gabbiani G, Desmoulière A. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh Migr*. 2012; 6:203-19. doi: 10.4161/cam.20377.

Pandey PR, Saidou J, Watabe K. Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2010; 15:226-36. doi: 10.2741/3617.

Parisi, F.; Tesi, M.; Millanta, F.; Gnocchi, M.; Poli, A. M1 and M2 tumour-associated macrophages subsets in canine malignant mammary tumours: An immunohistochemical study. *Res. Vet. Sci*. 2021; 136: 32–38.

Payan-Carreira, R. Feline Mammary Fibroepithelial Hyperplasia: A Clinical Approach. In *Insights from Veterinary Medicine*; IntechOpen: London, UK, (2013).

Peña L, De Andrés PJ, Clemente M, Cuesta P, Pérez-Alenza MD. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol*. 2013; 50:94-105. doi: 10.1177/0300985812447830.

Peña L, Perez-Alenza MD, Rodriguez-Bertos A, Nieto A. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 78:141–8. doi: 10.1023/A:1022991802116.

Piconese S, Gri G, Tripodo C, Musio S, Gorzanelli A, Frossi B, Pedotti R, Pucillo CE, Colombo MP. Mast cells counteract regulatory T-cell suppression through interleukin-6 and OX40/OX40L axis toward Th17- cell differentiation. *Blood*. 2009; 114:2639-48. doi: 10.1182/blood-2009-05-220004.

Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14:447-62. doi: 10.1038/nri3700.

Posch F, Silina K, Leibl S, Mündlein A, Moch H, Siebenhüner A, Samaras P, Riedl J, Stotz M, Szkandera J, Stöger H, Pichler M, Stupp R, van den Broek M, Schraml P, Gerger A, Petrausch U, Winder T. Maturation of tertiary lymphoid structures and recurrence of stage II and III colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2017; 7:e1378844. doi: 10.1080/2162402X.2017.1378844.

Preziosi R, Sarli G, Benazzi C, Mandrioli L, Marcato PS. Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci*. 2002; 73:53-60. doi: 10.1016/s0034-5288(02)00042-5.

Raposo TP, Beirão BC, Pang LY, Queiroga FL, Argyle DJ. Inflammation and cancer: till death tears them apart. *Vet J*. 2015; 205:161-74. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.04.015.

Raposo TP, Pires I, Carvalho MI, Prada J, Argyle DJ, Queiroga FL. Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. 2015; 13:464-74. doi: 10.1111/vco.12067.

Ray P, Krishnamoorthy N, Oriss TB, Ray A. Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1183:104-22. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05122.x.

Remmerie A, Scott CL. Macrophages and lipid metabolism. *Cell Immunol*. 2018; 330:27-42. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.020.

Saeki K, Endo Y, Uchida K, Nishimura R, Sasaki N, Nakagawa T. Significance of tumor-infiltrating immune cells in spontaneous canine mammary gland tumor: 140 cases. *J Vet Med Sci.* 2012; 74:227- 30. doi: 10.1292/jvms.11-0118.

Salas Y, Márquez A, Diaz D, Romero L. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002- 2012: a growing animal health problem. *PLoS ONE.* 2015; 10:e0127381. doi: 10.1371/journal.pone.0127381.

Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, Wienert S, Van den Eynden G, Baehner FL, Penault-Llorca F, Perez EA, Thompson EA, Symmans WF, Richardson AL, Brock J, Criscitiello C, Bailey H, Ignatiadis M, Floris G, Sparano J, Kos Z, Nielsen T, Rimm DL, Allison KH, Reis-Filho JS, Loibl S, Sotiriou C, Viale G, Badve S, Adams S, Willard-Gallo K, Loi S; International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015; 26:259-71. doi: 10.1093/annonc/mdu450.

Samoszuk M, Kanakubo E, Chan JK. Degranulating mast cells in fibrotic regions of human tumors and evidence that mast cell heparin interferes with the growth of tumor cells through a mechanism involving fibroblasts. *BMC Cancer.* 2005; 5:121. doi: 10.1186/1471-2407-5-121.

Sautès-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2019; 19:307-325. doi: 10.1038/s41568-019-0144-6.

Sawatsubashi M, Yamada T, Fukushima N, Mizokami H, Tokunaga O, Shin T. Association of vascular endothelial growth factor and mast cells with angiogenesis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2000; 436:243-8. doi: 10.1007/s004280050037.

Schäfer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9:628-38. doi: 10.1038/nrm2455.

Schmieder A, Michel J, Schönhaar K, Goerdts S, Schledzewski K. Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages. *Semin Cancer Biol.* 2012; 22:289-97. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.02.002.

Schumacher TN, Thommen DS. Tertiary lymphoid structures in cancer. *Science.* 2022; 375:eabf9419. doi: 10.1126/science.abf9419.

Seixas F, Palmeira C, Pires MA, et al. Mammary invasive micropapillary carcinoma in cats: clinicopathologic features and nuclear DNA content. *Vet Pathol.* 2007; 44:842-848.

Seung BJ, Lim HY, Shin JI, Kim HW, Cho SH, Kim SH, Sur JH. CD204-Expressing Tumor-Associated Macrophages Are Associated With Malignant, High-Grade, and Hormone Receptor—Negative Canine Mammary Gland Tumors. *Vet. Pathol.* 2018; 55: 417-424.

Sfacteria A, Lanteri G, Grasso G, Macrì B, Mazzullo G. Mast cells in canine mammary gland tumour: number, distribution and EPOR positivity. *Vet Comp Oncol.* 2011; 9:310-5. doi: 10.1111/j.1476- 5829.2011.00277.x.

Sfacteria A, Mazzullo G, Bertani C, Calabrò P, De Vico G, Macrì B. Erythropoietin receptor expression in canine mammary tumor: an immunohistochemical study. *Vet Pathol.* 2005; 42:837-40. doi: 10.1354/vp.42-6-837.

Sfacteria A, Napoli E, Rifici C, Comisso D, Giambrone G, Mazzullo G, Marino G. Immune Cells and Immunoglobulin Expression in the Mammary Gland Tumors of Dog. *Animals (Basel).* 2021; 11:1189. doi: 10.3390/ani11051189.

Sharonov GV, Serebrovskaya EO, Yuzhakova DV, Britanova OV, Chudakov DM. B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20:294-307. doi: 10.1038/s41577-019-0257-x.

Skorupski KA, Overley B, Shofer FS, et al. Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. *J Vet Intern Med.* 2005; 19:52-55.

Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.* 2008; 18:349-55. doi: 10.1016/j.semcan.2008.03.004.

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer.* 2006; 42:717-27. doi: 10.1016/j.ejca.2006.01.003.

Singh JK, Simões BM, Howell SJ, Farnie G, Clarke RB. Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res.* 2013; 15:210. doi: 10.1186/bcr3436.

Sofopoulos M, Fortis SP, Vaxevanis CK, Sotiriadou NN, Arnoyianni N, Ardavanis A, Vlachodimitropoulos D, Perez SA, Baxevanis CN. The prognostic significance of peritumoral tertiary lymphoid structures in breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2019; 68: 1733-1745.

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009; 86:1065-73. doi: 10.1189/jlb.0609385.

Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J Vet Intern Med.* 2000; 14:266-70. doi: 10.1892/0891-6640(2000)014<0266:eosato>2.3.co;2.

Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol.* 2011; 48:85-97. doi: 10.1177/0300985810389480.

Soremno KU, Worley DR, Zappulli V. Tumors of the Mammary Gland. In Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 6th ed.; Vail, D.M., Thamm, D.H., Liptak, J.M., Eds.; Elsevier: St. Louis, MO, USA, (2020); pp. 604–625. doi: 10.1016/B978-0-323-59496-7.00028-1.

Sousa S, Brion R, Lintunen M, Kronqvist P, Sandholm J, Mönkkönen J, Kellokumpu-Lehtinen PL, Lauttia S, Tynninen O, Joensuu H, Heymann D, Määttä JA. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res.* 2015; 17:101. doi: 10.1186/s13058-015-0621-0.

Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer.* 2016; 4:59.

Thumser-Henner P, Nytko KJ, Rohrer Bley C. Mutations of BRCA2 in canine mammary tumors and their targeting potential in clinical therapy. *BMC Vet Res.* 2020; 16:30. doi: 10.1186/s12917-020-2247-4.

Tiainen S, Tumelius R, Rilla K, Hämäläinen K, Tammi M, Tammi R, Kosma VM, Oikari S, Auvinen P. High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology.* 2015; 66: 873–883.

Trüb M, Zippelius A. Tertiary Lymphoid Structures as a Predictive Biomarker of Response to Cancer Immunotherapies. *Front. Immunol.* 2021; 12:674565. doi: 10.3389/fimmu.2021.674565.

Urbano AC, Nascimento C, Soares M, Correia J, Ferreira F. Clinical Relevance of the serum CTLA-4 in Cats with Mammary Carcinoma. *Sci Rep.* 2020; 10: 1-11. doi:10.1038/s41598-020-60860-3.

Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011; 147:275-92. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.024.

Varricchi G, Galdiero MR, Loffredo S, Marone G, Iannone R, Marone G, Granata F. Are Mast Cells Masters in Cancer? *Front Immunol.* 2017; 8:424. doi: 10.3389/fimmu.2017.00424.

Vascellari, M.; Baioni, E.; Ru, G.; Carminato, A.; Mutinelli, F. Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: Incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *BMC Vet. Res.* 2009; 5:39.

Vinayak S, Gray RJ, Adams S et al. Association of increased tumor- infiltrating lymphocytes (TILs) with immunomodulatory (IM) triple- negative breast cancer (TNBC) subtype and response to neoadjuvant platinum-based therapy in PrECOG0105. *J Clin Oncol* 2014; 32: 5.

Vitasek, R. and Dendisova, H. 2006. Treatment of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of proligestone. *Acta. Vet. Brno.* 2006; 75:295–297.

Wehrend, A., Hospes, R. and Gruber, A.D. Treatment of feline mammary fibroadenomatous hyperplasia with a progesterone-antagonist. *Vet. Rec.* 2001; 148, 346–347.

Weijer K, Hart AA. Prognostic factors in feline mammary carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1983; 70:709–716.

Williams TM, Medina F, Badano I, Hazan RB, Hutchinson J, Muller WJ, Chopra NG, Scherer PE, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem.* 2004; 279:51630-46. doi: 10.1074/jbc.M409214200.

Wölfle, U., Seelinger, G. and Schempp, C.M. Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta. Med.* 2014; 80, 109–120.

Yang B, Ma C, Chen Z, Yi W, McNutt MA, Wang Y, Korteweg C, Gu J. Correlation of immunoglobulin G expression and histological subtype and stage in breast cancer. *PLoS One.* 2013; 8:e58706. doi: 10.1371/journal.pone.0058706.

Yang XD, Ai W, Asfaha S, Bhagat G, Friedman RA, Jin G, Park H, Shykind B, Diacovo TG, Falus A, Wang TC. Histamine deficiency promotes inflammation-associated carcinogenesis through reduced myeloid maturation and accumulation of CD11b+Ly6G+ immature myeloid cells. *Nat Med.* 2011; 17:87-95. doi: 10.1038/nm.2278.

Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, Yao Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther.* 2014; 141:125-39. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.09.004.

Yu GH, Sethi S, Cajulis RS, Gokaslan ST, Frias-Hidvegi D. Benign pairs. A useful discriminating feature in fine needle aspirates of the breast. *Acta Cytol.* 1997; 41:721-6. doi: 10.1159/000332692.

Zappulli V, De Zan G, Cardazzo B, et al. Feline mammary tumours in comparative oncology. *J Dairy Res.* 2005; 72:98–106.

Zappulli V, Rasotto R, Caliari D, Mainenti M, Peña L, Goldschmidt MH, Kiupel M. Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas: A Review of the Literature. *Vet. Pathol.* 2015; 52:46–60.

Zappulli V, Pena L, Rasotto R, Goldschmidt MH, Gama A, Scruggs JL, Kiupel M. *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals. Volume 2: Mammary Tumors*; Davis-Thompson Foundation: Washington, DC, USA, 2019.

Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjällman AH, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer.* 2006; 95:272-81. doi: 10.1038/sj.bjc.6603240.

Zhang J, Niu N, Li B, McNutt MA. Neuron-derived IgG protects neurons from complement-dependent cytotoxicity. *J Histochem Cytochem.* 2013; 61:869-79. doi: 10.1369/0022155413504196.

Zhao Y, Liu Y, Chen Z, Korteweg C, Gu J. Immunoglobulin g (IgG) expression in human umbilical cord endothelial cells. *J Histochem Cytochem.* 2011; 59:474-88. doi: 10.1369/0022155411400871.

Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, Rafidi K, Seftor E, Sager R. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science.* 1994; 263:526-9. doi: 10.1126/science.8290962.

APPENDICE I

Questionario tratto da Supplement Material, Salgado et al., 2014

1. Potresti dettagliare la metodologia che hai utilizzato nel tuo studio?
2. A quale ingrandimento del microscopio hai valutato i vetrini?
3. Lo spessore della sezione è importante?
4. Hai valutato i TIL in zone con artefatti?
5. I vetrini sono stati valutati individualmente o da due patologi insieme o indipendentemente?
6. Nel caso di sezioni complete, quante sezione hai valutato per paziente?
7. Hai valutato l'eterogeneità tra le sezioni dei TIL per definire il numero di sezioni da leggere per paziente?
8. Hai valutato le strutture linfoidi terziarie (TLS)?
9. Come hai affrontato l'eterogeneità dell'infiltrazione di TIL all'interno di un vetrino?
10. Ti sei limitato a linfociti e plasmacellule o hai preso in considerazione anche altre cellule, per esempio neutrofili?
11. Hai considerato il compartimento stromale e intra-tumorale (= all'interno dei nidi tumorali) come separati o insieme?
12. Hai preso in considerazione tutti i TIL o i TIL erano intorno a 1. carcinoma duttale in situ, 2. condotti normali o 3. aree di necrosi non presa in considerazione?
13. Potresti dettagliare il numero totale di pazienti analizzati, il sottotipo di tumore al seno in cui erano i TIL analizzati e se il trattamento è stato ricevuto o meno?
14. Potresti dettagliare se il punteggio è stato eseguito su biopsie centrali o su sezioni complete?
15. Hai usato metodi alternativi per valutare i TIL, come programmi digitali o immunoistochimica? Se è stato utilizzato IHC, indicare gli epitopi che hai marcato.

APPENDICE II

| Diagnosi | Istologico | Area |
|---|-------------------------|-----------------|
| <i>Carcinoma tubulopapillare</i> | 258 1 5x | 764198 |
| | 258 2 5x | 884544 |
| | 258 3 5x | 354452 |
| <i>Carcinoma intraduttale papillare</i> | 329 1 5x | 505768 |
| | 329 1 5x (2) | 479572 |
| | 329 3 5x | 1779532 |
| <i>Carcinoma solido</i> | 329 5 5x | 851024 |
| | 617B 5x | 72400 |
| | 617B 5x (2) | 78554 |
| | 617B 5x (3) | 67320 |
| | 617b 5x (4) | 295474 |
| | 617b 5x 2 | 352116 |
| | 617 5x 4 | 292340 |
| | 618 5x 4 (2) | 95756 |
| | 617 5x 5 | 105982 |
| | 618 5x 5 (2) | 90240 |
| | 617 5x 6 | 124940 |
| | 617 5x 7 | 1118174 |
| | 617 5x 8 | 240032 |
| | 617 5x 10 | 330836 |
| | 617 5x 10 (2) | 277120 |
| | 617 5x 11 | 142632 |
| | 617 5x 12 | 55584 |
| <i>Carcinoma tubulare</i> | 617 5x 12 (2) | 176740 |
| | 617 5x 12 (3) | 175114 |
| | 895 A 1 5x | 1435604 |
| | 895 A 3 5x | 301864 |
| | 895 A 3 5x (2) | 422662 |
| | 895 A 3 5x (3) | 69756 |
| | 895 A 3 5x (4) | 152578 |
| | 895 A 3 5x (5) | 90960 |
| | 895 A 12 5x | 85942 |
| | 895 A 14 5x | 308124 |
| | 895 A 14 5x (2) | 148926 |
| | 895 A 16 5x | 396746 |
| | 895 A 16 5x (2) | 230296 |
| | 895 A 18 5x | 111930 |
| | 895 A 18 5x (2) | 524458 |
| | 895 A 18 5x (3) | 160170 |
| | <i>Carcinoma solido</i> | 895 A 18 5x (4) |
| 974 A 5x 1 | | 1049428 |
| 974 A 5x 2 | | 91480 |
| 974 A 5x 2 (2) | | 133542 |
| 974 A 5x 2 (3) | | 208112 |
| 974 A 5x 3 | | 241732 |
| 974 A 5x 3 (2) | | 75166 |
| 974 A 5x 3 (3) | | 91614 |
| 974 A 5x 3 (4) | | 204370 |
| 974 A 5x 3 (5) | | 37320 |
| 974 A 5x 5 | | 190280 |
| 974 A 5x 5 (2) | | 57.166 |
| 974 A 5x 5 (3) | | 74.600 |
| 974 A 5x 5 (4) | | 270.838 |
| 974 A 5x 5 (5) | | 130.064 |
| 974 A 5x 6 | | 367974 |
| 974 A 5x 10 | | 169088 |
| 974 A 5x 10 (2) | 427112 | |
| 974 A 5x 11 | 74636 | |
| 974 A 5x 11 (2) | 161790 | |

Carcinoma micropapillare

| | |
|-----------------|---------|
| 974 A 5X 12 | 107364 |
| 974 A 5X 13 | 52766 |
| 974 A 5X 13 (2) | 159606 |
| 974 A 5X 13 (3) | 199476 |
| 974 A 5X 13 (4) | 53360 |
| 974 A 5X 14 | 138970 |
| 974 A 5X 14 (2) | 395952 |
| 974 A 5X 15 | 331638 |
| 974 A 5X 16 | 278852 |
| 62/B | 145302 |
| 62/B 5x 2 | 42130 |
| 62/B 5x 3 | 65842 |
| 62/B 5x 3 (2) | 52986 |
| 62/B 5x 3 (3) | 17600 |
| 62/B 5x 4 | 154480 |
| 62/B 5x 4 (2) | 22286 |
| 62/B 5x 4 (3) | 43780 |
| 62/B 5x 5 | 206196 |
| 62/B 5x 5 (2) | 24402 |
| 62/B 5x 5 (3) | 32576 |
| 62/B 5x 5 (4) | 10076 |
| 62/B 5x 5 (5) | 15620 |
| 62/B 5x 5 (6) | 65914 |
| 62/B 5x 5 (7) | 17226 |
| 62/B 5x 6 | 1165392 |
| 62/B 5x 6 (2) | 65852 |
| 62/B 5x 6 (3) | 91124 |
| 62/B 5x 7 | 629150 |
| 62/B 5x 7 (2) | 30488 |
| 62/B 5x 8 | 133268 |
| 62/B 5x 8 (2) | 94944 |
| 62/B 5x 8 (3) | 255468 |
| 62/B 5x 8 (4) | 275672 |
| 62/B 5x 8 (5) | 27450 |
| 62/B 5x 8 (6) | 41926 |
| 62/B 5x 8 (7) | 20210 |
| 62/B 5x 9 | 357052 |
| 62/B 5x 9 (2) | 41856 |
| 62/B 5x 9 (3) | 110910 |
| 62/B 5x 9 (4) | 28294 |
| 62/B 5x 9 (5) | 186168 |
| 62/B 5x 9 (6) | 27274 |
| 62/B 5x 10 | 395812 |
| 62/B 5x 10 (2) | 38240 |
| 62/B 5x 10 (3) | 12492 |
| 62/B 5x 10 (4) | 162244 |
| 62/B 5x 10 (5) | 57328 |
| 62/B 5x 10 (6) | 121572 |
| 62/B 5x 10 (7) | 16516 |
| 62/B 5x 10 (8) | 23284 |
| 62/B 5x 11 | 332604 |
| 62/B 5x 11 (2) | 96394 |
| 62/B 5x 11 (3) | 27690 |
| 62/B 5x 11 (4) | 43408 |
| 62/B 5x 11 (5) | 269536 |
| 62/B 5x 12 | 109046 |
| 62/B 5x 12 (2) | 149614 |
| 62/B 5x 12 (3) | 90314 |
| 62/B 5x 12 (4) | 109082 |
| 62/B 5x 12 (5) | 27586 |
| 62/B 5x 12 (6) | 52394 |
| 62/B 5x 13 | 69712 |
| 62/B 5x 13 (2) | 35488 |
| 62/B 5x 13 (3) | 23910 |
| 62/B 5x 14 | 147086 |
| 62/B 5x 14 (2) | 19930 |
| 62/B 5x 14 (3) | 31952 |
| 62/B 5x 14 (4) | 57054 |

| | |
|-----------------|--------|
| 62/B 5x 14 (5) | 88414 |
| 62/B 5x 14 (6) | 22370 |
| 62/B 5x 14 (7) | 71534 |
| 62/B 5x 14 (8) | 26270 |
| 62/B 5x 14 (9) | 41232 |
| 62/B 5x 14 (10) | 19904 |
| 62/B 5x 14 (11) | 185380 |
| 62/B 5x 16 | 271668 |
| 62/B 5x 16 (2) | 122008 |
| 62/B 5x 16 (3) | 72350 |
| 62/B 5x 16 (4) | 45080 |
| 62/B 5x 16 (5) | 175356 |
| 62/B 5x 16 (6) | 294910 |
| 62/B 5x 17 | 148482 |
| 62/B 5x 17 (2) | 353980 |
| 62/B 5x 17 (3) | 282654 |
| 62/B 5x 17 (4) | 100106 |
| 62/B 5x 17 (5) | 36074 |
| 62/B 5x 18 | 113494 |
| 62/B 5x 18 (2) | 139150 |
| 62/B 5x 18 (3) | 10538 |
| 62/B 5x 18 (4) | 247752 |
| 62/B 5x 18 (5) | 160278 |
| 62/B 5x 18 (6) | 122472 |
| 62/B 5x 18 (7) | 82968 |
| 62/B 5x 18 (8) | 139080 |
| 62/B 5x 19 | 53766 |
| 62/B 5x 19 (2) | 15982 |
| 62/B 5x 19 (3) | 22134 |
| 62/B 5x 19 (4) | 85618 |
| 62/B 5x 19 (5) | 117390 |
| 62/B 5x 19 (6) | 220470 |
| 62/B 5x 19 (7) | 34438 |
| 62/B 5x 19 (8) | 27530 |
| 62/B 5x 19 (9) | 16712 |
| 62/B 5x 19 (10) | 141350 |
| 62/B 5x 19 (11) | 8700 |
| 62/B 5x 20 | 64270 |
| 62/B 5x 20(2) | 253080 |
| 62/B 5x 20(3) | 79562 |
| 62/B 5x 20(4) | 15316 |
| 62/B 5x 20(5) | 26694 |
| 62/B 5x 20(6) | 65924 |
| 62/B 5x 21 | 168024 |
| 62/B 5x 21 (2) | 17788 |
| 62/B 5x 21 (3) | 297822 |
| 62/B 5x 21 (4) | 74042 |
| 62/B 5x 21 (5) | 45940 |
| 62/B 5x 21 (6) | 19276 |
| 62/B 5x 22 | 72030 |
| 62/B 5x 22 (3) | 59776 |
| 62/B 5x 22 (4) | 33762 |
| 62/B 5x 22 (5) | 32178 |
| 62/B 5x 22 (6) | 46962 |
| 62/B 5x 22 (7) | 16044 |
| 62/B 5x 22 (8) | 52836 |
| 62/B 5x 23 | 53530 |
| 62/B 5x 23 (2) | 95704 |
| 62/B 5x 23 (3) | 337706 |
| 62/B 5x 23 (4) | 46296 |
| 62/B 5x 23 (5) | 97620 |
| 62/B 5x 23 (6) | 22282 |
| 62/B 5x 23 (7) | 67616 |
| 62/B 5x 23 (8) | 34836 |
| 62/B 5x 23 (9) | 15206 |
| 62/B 5x 24 | 48012 |
| 62/B 5x 24 (2) | 6352 |
| 62/B 5x 24 (3) | 14280 |

| | |
|-----------------|--------|
| 62/B 5x 24 (4) | 35040 |
| 62/B 5x 24 (5) | 105686 |
| 62/B 5x 24 (6) | 241408 |
| 62/B 5x 24 (7) | 7934 |
| 62/B 5x 24 (8) | 6084 |
| 62/B 5x 24 (9) | 13422 |
| 62/B 5x 24 (10) | 15902 |
| 62/B 5x 25 | 136896 |
| 62/B 5x 25 (2) | 282502 |
| 62/B 5x 25 (3) | 51232 |
| 62/B 5x 25 (4) | 62876 |
| 62/B 5x 25 (5) | 19106 |
| 62/B 5x 25 (6) | 52676 |
| 62/B 5x 25 (7) | 12778 |
| 62/B 5x 25 (8) | 46572 |
| 62/B 5x 25 (9) | 23930 |
| 62/B 5x 25 (10) | 66954 |
| 62/B 5x 26 | 17149 |
| 62/B 5x 26 (2) | 50418 |
| 62/B 5x 26 (3) | 36712 |
| 62/B 5x 26 (4) | 125534 |
| 62/B 5x 26 (5) | 52474 |
| 62/B 5x 26 (6) | 54874 |
| 62/B 5x 26 (7) | 120534 |
| 62/B 5x 26 (8) | 47836 |
| 62/B 5x 26 (9) | 232366 |
| 62/B 5x 26 (10) | 53086 |
| 62/B 5x 26 (11) | 26710 |
| 62/B 5x 26 (12) | 41352 |
| 62/B 5x 27 | 186354 |
| 62/B 5x 27 (2) | 47104 |
| 62/B 5x 27 (3) | 48368 |
| 62/B 5x 27 (4) | 94246 |
| 62/B 5x 27 (5) | 32674 |
| 62/B 5x 27 (6) | 42412 |
| 62/B 5x 27 (7) | 46092 |
| 62/B 5x 27 (8) | 151266 |
| 62/B 5x 27 (9) | 120356 |
| 62/B 5x 27 (10) | 45266 |
| 62/B 5x 28 | 71846 |
| 62/B 5x 28 (2) | 17514 |
| 62/B 5x 28 (3) | 151730 |
| 62/B 5x 28 (4) | 94042 |
| 62/B 5x 28 (5) | 70796 |
| 62/B 5x 28 (6) | 33602 |
| 62/B 5x 28 (7) | 82260 |
| 62/B 5x 28 (8) | 45462 |
| 62/B 5x 28 (9) | 56616 |
| 62/B 5x 28 (10) | 157700 |
| 62/B 5x 28 (11) | 87610 |
| 62/B 5x 28 (12) | 35454 |
| 62/B 5x 28 (13) | 65430 |
| 62/B 5x 29 | 116054 |
| 62/B 5x 29 (2) | 75118 |
| 62/B 5x 29 (3) | 27566 |
| 62/B 5x 29 (4) | 23666 |
| 62/B 5x 29 (5) | 8494 |
| 62/B 5x 29 (6) | 9918 |
| 62/B 5x 29 (7) | 9258 |
| 62/B 5x 30 | 98656 |
| 62/B 5x 30 (2) | 22402 |
| 62/B 5x 30 (3) | 137192 |
| 62/B 5x 30 (4) | 25416 |
| 62/B 5x 31 | 70882 |
| 62/B 5x 31 (2) | 89776 |
| 62/B 5x 31 (3) | 53120 |
| 62/B 5x 31 (4) | 36608 |
| 62/B 5x 31 (5) | 29292 |

| | |
|-----------------|--------|
| 62/B 5x 32 | 127810 |
| 62/B 5x 32 (2) | 41856 |
| 62/B 5x 32 (3) | 39920 |
| 62/B 5x 32 (4) | 60480 |
| 62/B 5x 33 | 69690 |
| 62/B 5x 33 (2) | 15242 |
| 62/B 5x 33 (3) | 118048 |
| 62/B 5x 34 | 149430 |
| 62/B 5x 34 (2) | 111790 |
| 62/B 5x 34 (3) | 35402 |
| 62/B 5x 34 (4) | 28984 |
| 62/B 5x 34 (5) | 21430 |
| 62/B 5x 35 | 101380 |
| 62/B 5x 35 (2) | 15438 |
| 62/B 5x 35 (3) | 25078 |
| 62/B 5x 36 | 159226 |
| 62/B 5x 36 (2) | 46778 |
| 62/B 5x 36 (3) | 52944 |
| 62/B 5x 36 (4) | 27448 |
| 62/B 5x 36 (5) | 33484 |
| 62/B 5x 37 | 83828 |
| 62/B 5x 37 (2) | 53604 |
| 62/B 5x 37 (3) | 112004 |
| 62/B 5x 37 (4) | 34906 |
| 62/B 5x 37 (5) | 24898 |
| 62/B 5x 37 (6) | 44498 |
| 62/B 5x 37 (7) | 13352 |
| 62/B 5x 37 (8) | 40802 |
| 62/B 5x 38 | 83246 |
| 62/B 5x 38 (2) | 345694 |
| 62/B 5x 38 (3) | 79214 |
| 62/B 5x 38 (4) | 45122 |
| 62/B 5x 38 (5) | 233514 |
| 62/B 5x 38 (6) | 284074 |
| 62/B 5x 38 (7) | 15414 |
| 62/B 5x 38 (8) | 6852 |
| 62/B 5x 39 | 129958 |
| 62/B 5x 39 (2) | 178616 |
| 62/B 5x 39 (3) | 85612 |
| 62/B 5x 39 (4) | 491114 |
| 62/B 5x 39 (5) | 219718 |
| 62/B 5x 39 (6) | 118068 |
| 62/B 5x 40 | 330414 |
| 62/B 5x 40 (2) | 165848 |
| 62/B 5x 40 (3) | 209252 |
| 62/B 5x 40 (4) | 202496 |
| 62/B 5x 40 (5) | 190456 |
| 62/B 5x 41 | 251346 |
| 62/B 5x 41 (2) | 84066 |
| 62/B 5x 41 (3) | 70026 |
| 62/B 5x 41 (4) | 15902 |
| 62/B 5x 42 | 27872 |
| 62/B 5x 42 (2) | 425560 |
| 62/B 5x 42 (3) | 328362 |
| 62/B 5x 42 (4) | 44072 |
| 62/B 5x 43 | 131648 |
| 62/B 5x 43 (2) | 43474 |
| 62/B 5x 43 (3) | 54542 |
| 62/B 5x 43 (4) | 10104 |
| 62/B 5x 43 (5) | 75164 |
| 62/B 5x 43 (6) | 26448 |
| 62/B 5x 43 (8) | 34670 |
| 62/B 5x 43 (9) | 43934 |
| 62/B 5x 43 (10) | 74062 |
| 62/B 5x 44 | 153526 |
| 62/B 5x 44 (2) | 115894 |
| 62/B 5x 44 (3) | 18726 |
| 62/B 5x 44 (4) | 166474 |

| | |
|-----------------|--------|
| 62/B 5x 44 (5) | 58010 |
| 62/B 5x 44 (6) | 57256 |
| 62/B 5x 44 (7) | 31512 |
| 62/B 5x 44 (8) | 378058 |
| 62/B 5x 44 (9) | 39418 |
| 62/B 5x 44 (10) | 168198 |
| 62/B 5x 45 | 153196 |
| 62/B 5x 46 | 108958 |
| 62/B 5x 46 (2) | 93978 |
| 62/B 5x 46 (3) | 48906 |
| 62/B 5x 46 (4) | 168896 |
| 62/B 5x 46 (5) | 198302 |
| 62/B 5x 46 (6) | 33062 |
| 62/B 5x 47 | 104958 |
| 62/B 5x 47 (2) | 10986 |
| 62/B 5x 47 (3) | 83626 |
| 62/B 5x 47 (4) | 31918 |
| 62/B 5x 48 | 86236 |
| 62/B 5x 49 | 709422 |
| 62/B 5x 49 (2) | 59650 |
| 62/B 5x 49 (3) | 250542 |
| 62/B 5x 49 (4) | 66840 |
| 62/B 5x 50 | 59372 |
| 62/B 5x 50 (2) | 48226 |
| 62/B 5x 50 (3) | 108332 |
| 62/B 5x 50 (4) | 60044 |
| 62/B 5x 50 (5) | 150100 |
| 62/B 5x 50 (6) | 96210 |
| 62/B 5x 50 (7) | 274800 |
| 62/B 5x 50 (8) | 48348 |
| 62/B 5x 51 | 868910 |
| 62/B 5x 51 (2) | 341146 |
| 62/B 5x 51 (3) | 42874 |
| 62/B 5x 52 | 518206 |
| 62/B 5x 52 (2) | 143896 |
| 62/B 5x 52 (3) | 73102 |
| 62/B 5x 52 (4) | 71324 |
| 62/B 5x 52 (5) | 52926 |
| 62/B 5x 54 | 28466 |
| 62/B 5x 54 (2) | 39350 |
| 62/B 5x 54 (3) | 39538 |
| 62/B 5x 54 (4) | 57372 |
| 62/B 5x 54 (5) | 55788 |
| 62/B 5x 54 (6) | 40084 |
| 62/B 5x 54 (7) | 39788 |
| 62/B 5x 54 (8) | 46412 |
| 62/B 5x 54 (9) | 164894 |
| 62/B 5x 54 (10) | 13546 |
| 62/B 5x 55 | 29306 |
| 62/B 5x 55 (2) | 12046 |
| 62/B 5x 55 (3) | 7828 |
| 62/B 5x 55 (4) | 64994 |
| 62/B 5x 55 (5) | 195242 |
| 62/B 5x 55 (6) | 70468 |
| 62/B 5x 55 (7) | 108868 |
| 62/B 5x 55 (8) | 115656 |
| 62/B 5x 55 (9) | 34298 |
| 62/B 5x 55 (10) | 54088 |
| 62/B 5x 55 (11) | 40706 |
| 62/B 5x 56 | 41358 |
| 62/B 5x 56 (2) | 284498 |
| 62/B 5x 56 (3) | 128868 |
| 62/B 5x 56 (4) | 32126 |
| 62/B 5x 56 (5) | 71604 |
| 62/B 5x 56 (6) | 132720 |
| 62/B 5x 56 (7) | 116580 |
| 62/B 5x 56 (8) | 62080 |
| 62/B 5x 56 (9) | 59268 |

Comedocarcinoma

Adenocarcinoma squamoso

| | |
|-----------------|--------|
| 62/B 5x 56 (10) | 55246 |
| 62/B 5x 56 (11) | 29400 |
| 62/B 5x 58 | 168114 |
| 62/B 5x 58 (2) | 16250 |
| 62/B 5x 58 (3) | 193094 |
| 62/B 5x 58 (4) | 34214 |
| 62/B 5x 58 (5) | 81768 |
| 62/B 5x 58 (6) | 73846 |
| 62/B 5x 58 (7) | 30010 |
| 62/B 5x 58 (8) | 62618 |
| 62/B 5x 59 | 100372 |
| 62/B 5x 59 (1) | 103856 |
| 62/B 5x 59 (2) | 29866 |
| 62/B 5x 59 (3) | 232900 |
| 62/B 5x 59 (4) | 265182 |
| 62/B 5x 59 (5) | 246686 |
| 62/B 5x 59 (6) | 193846 |
| 62/B 5x 59 (7) | 45528 |
| 62/B 5x 59 (8) | 45330 |
| 62/B 5x 60 | 106416 |
| 62/B 5x 60 (2) | 11060 |
| 62/B 5x 60 (3) | 18278 |
| 62/B 5x 60 (4) | 29134 |
| 62/B 5x 60 (5) | 36822 |
| 62/B 5x 60 (6) | 41588 |
| 62/B 5x 61 | 58290 |
| 62/B 5x 61 (2) | 6390 |
| 62/B 5x 61 (3) | 66836 |
| 62/B 5x 61 (4) | 13082 |
| 62/B 5x 61 (5) | 28020 |
| 62/B 5x 61 (6) | 48226 |
| 62/B 5x 61 (7) | 29372 |
| 62/B 5x 61 (8) | 39070 |
| 62/B 5x 61 (9) | 14170 |
| 62/B 5x 62 | 62622 |
| 62/B 5x 62 (2) | 53038 |
| 62/B 5x 62 (3) | 134126 |
| 62/B 5x 62 (4) | 48268 |
| 62/B 5x 62 (5) | 99732 |
| 62/B 5x 62 (6) | 26454 |
| 62/B 5x 62 (7) | 68700 |
| 62/B 5x 62 (8) | 76722 |
| 590/B 5x | 311854 |
| 590/B 5x (2) | 109612 |
| 590/B 5x (3) | 156122 |
| 590/B 5x (4) | 143450 |
| 590/B 5x (5) | 12284 |
| 590/B 5x (6) | 57574 |
| 590/B 5x (7) | 103798 |
| 590/B 5x 1 | 72066 |
| 590/B 5x 1 (2) | 233838 |
| 590/B 5x 1 (3) | 134962 |
| 590/B 5x 1 (4) | 46106 |
| 590/B 5x 1 (5) | 45120 |
| 590/B 5x 1 (6) | 16874 |
| 590/B 5x 1 (7) | 9952 |
| 590/B 5x 1 (8) | 49974 |
| 590/B 5x 1 (9) | 19880 |
| 590/B 5x 1 (10) | 20330 |
| 590/B 5x 2 | 17542 |
| 590/B 5x 2 (2) | 118418 |
| 590/B 5x 2 (3) | 46922 |
| 590/B 5x 2 (4) | 119492 |
| 590/B 5x 2 (5) | 41704 |
| 590/B 5x 2 (6) | 3478 |
| 590/B 5x 2 (7) | 6706 |
| 590/B 5x 2 (8) | 14542 |
| RI 28.21 | 103400 |

| | |
|-----------------|--------|
| RI 28.21 (2) | 37570 |
| RI 28.21 (3) | 75922 |
| RI 28.21 (4) | 101640 |
| RI 28.21 (5) | 104304 |
| RI 28.21 (6) | 106490 |
| RI 28.21 (7) | 153874 |
| RI 28.21 (8) | 11508 |
| RI 28.21 (9) | 93714 |
| RI 28.21 (10) | 97792 |
| RI 28.21 (11) | 114928 |
| RI 28.21 (12) | 116618 |
| RI 28.21 2 | 90674 |
| RI 28.21 2 (2) | 109288 |
| RI 28.21 2 (3) | 59406 |
| RI 28.21 2 (4) | 44196 |
| RI 28.21 2 (5) | 70754 |
| RI 28.21 2 (6) | 114412 |
| RI 28.21 2 (7) | 56340 |
| RI 28.21 2 (8) | 108286 |
| RI 28.21 2 (9) | 67208 |
| RI 28.21 2 (10) | 65422 |
| RI 28.21 2 (11) | 92616 |
| RI 28.21 2 (12) | 143128 |
| RI 28.21 2 (13) | 95218 |
| RI 28.21 2 (14) | 79342 |
| RI 28.21 2 (15) | 35074 |
| RI 28.21 2 (16) | 123638 |
| RI 28.21 3 | 119812 |
| RI 28.21 3 (2) | 314156 |
| RI 28.21 3 (3) | 57986 |
| RI 28.21 3 (4) | 270598 |
| RI 28.21 3 (5) | 88698 |
| RI 28.21 3 (6) | 132292 |
| RI 28.21 3 (7) | 124720 |
| RI 28.21 3 (8) | 160262 |
| RI 28.21 3 (9) | 230720 |
| RI 28.21 3 (10) | 96706 |
| RI 28.21 3 (11) | 217416 |
| RI 28.21 6 | 45272 |
| RI 28.21 6 (2) | 119534 |
| RI 28.21 6 (3) | 68848 |
| RI 28.21 6 (4) | 59920 |
| RI 28.21 6 (5) | 32720 |
| RI 28.21 6 (6) | 25794 |
| RI 28.21 6 (7) | 193410 |
| RI 28.21 6 (8) | 32820 |
| RI 28.21 7 | 22374 |
| RI 28.21 7 (2) | 36234 |
| RI 28.21 7 (3) | 185158 |
| RI 28.21 7 (4) | 62176 |
| RI 28.21 7 (5) | 25470 |
| RI 28.21 7 (6) | 22862 |
| RI 28.21 7 (7) | 36648 |
| RI 28.21 7 (8) | 74570 |
| RI 28.21 7 (9) | 29524 |
| RI 28.21 8 | 100914 |
| RI 28.21 8 (2) | 155718 |
| RI 28.21 9 | 99560 |
| RI 28.21 9 (2) | 474022 |
| RI 28.21 9 (3) | 179666 |
| RI 28.21 9 (4) | 219568 |
| RI 28.21 9 (5) | 89242 |
| RI 28.21 9 (6) | 58164 |
| RI 28.21 9 (7) | 43736 |
| RI 28.21 10 | 133784 |
| RI 28.21 10 (2) | 41626 |
| RI 28.21 10 (3) | 112914 |
| RI 28.21 10 (4) | 74474 |

| | |
|------------------|--------|
| RI 28.21 10 (5) | 17452 |
| RI 28.21 10 (6) | 151670 |
| RI 28.21 10 (7) | 77238 |
| RI 28.21 10 (8) | 46516 |
| RI 28.21 10 (9) | 121060 |
| RI 28.21 10 (10) | 14778 |
| RI 28.21 10 (11) | 66402 |
| RI 28.21 10 (12) | 113650 |
| RI 28.21 10 (13) | 44888 |
| RI 28.21 10 (14) | 123692 |
| RI 28.21 10 (15) | 58468 |
| RI 28.21 10 (16) | 15692 |
| RI 28.21 10 (17) | 147746 |
| RI 28.21 11 | 175986 |
| RI 28.21 11 (2) | 77458 |
| RI 28.21 11 (3) | 151154 |
| RI 28.21 11 (4) | 139652 |
| RI 28.21 11 (5) | 112620 |
| RI 28.21 11 (6) | 80410 |
| RI 28.21 11 (7) | 62580 |
| RI 28.21 11 (8) | 170790 |
| RI 28.21 11 (9) | 8558 |
| RI 28.21 11 (10) | 24380 |
| RI 28.21 12 | 725226 |
| RI 28.21 12 (2) | 50218 |
| RI 28.21 15 | 18338 |
| RI 28.21 15 (2) | 9940 |
| RI 28.21 15 (3) | 10078 |
| RI 28.21 15 (4) | 63636 |
| RI 28.21 15 (5) | 37684 |
| RI 28.21 15 (6) | 179108 |
| RI 28.21 15 (7) | 5018 |
| RI 28.21 15 (8) | 29620 |
| RI 28.21 15 (9) | 58744 |
| RI 28.21 16 | 118596 |
| RI 28.21 16 (2) | 63750 |
| RI 28.21 16 (3) | 31602 |
| RI 28.21 16 (4) | 169536 |
| RI 28.21 16 (5) | 24606 |
| RI 28.21 17 | 379854 |
| RI 28.21 17 (2) | 289442 |
| RI 28.21 17 (3) | 496294 |
| RI 28.21 17 (4) | 44746 |
| RI 28.21 17 (5) | 13302 |
| RI 28.21 17 (6) | 74618 |
| RI 28.21 17 (7) | 51960 |
| RI 28.21 17 (8) | 93914 |
| RI 28.21 17 (9) | 62978 |
| RI 28.21 17 (10) | 6568 |
| RI 28.21 17 (11) | 12350 |
| RI 28.21 18 | 219738 |
| RI 28.21 18 (2) | 305374 |
| RI 28.21 18 (3) | 306522 |
| RI 28.21 18 (4) | 379862 |
| RI 28.21 18 (5) | 87440 |
| RI 28.21 18 (6) | 255102 |
| RI 28.21 18 (7) | 218980 |
| RI 28.21 18 (8) | 449392 |
| RI 28.21 18 (9) | 534516 |
| RI 28.21 18 (10) | 131466 |
| RI 28.21 19 | 660590 |
| RI 28.21 19 (2) | 310924 |
| RI 28.21 19 (3) | 16578 |
| RI 28.21 19 (4) | 12352 |
| RI 28.21 19 (5) | 57098 |
| RI 28.21 19 (6) | 59776 |
| RI 28.21 19 (7) | 133220 |
| RI 28.21 20 | 429450 |

| | |
|------------------|--------|
| RI 28.21 20 (2) | 116056 |
| RI 28.21 20 (3) | 410728 |
| RI 28.21 20 (4) | 93068 |
| RI 28.21 20 (5) | 245478 |
| RI 28.21 20 (6) | 68732 |
| RI 28.21 20 (7) | 60374 |
| RI 28.21 20 (8) | 22904 |
| RI 28.21 23 | 601574 |
| RI 28.21 23 (2) | 289094 |
| RI 28.21 23 (3) | 21428 |
| RI 28.21 23 (4) | 8526 |
| RI 28.21 23 (5) | 31450 |
| RI 28.21 23 (6) | 43876 |
| RI 28.21 23 (7) | 89876 |
| RI 28.21 23 (8) | 40394 |
| RI 28.21 23 (9) | 25818 |
| RI 28.21 24 | 130954 |
| RI 28.21 24 (2) | 93166 |
| RI 28.21 24 (3) | 136558 |
| RI 28.21 24 (4) | 73860 |
| RI 28.21 24 (5) | 62694 |
| RI 28.21 24 (6) | 12772 |
| RI 28.21 24 (7) | 178912 |
| RI 28.21 24 (8) | 255214 |
| RI 28.21 25 | 68924 |
| RI 28.21 25 (2) | 37388 |
| RI 28.21 25 (3) | 75784 |
| RI 28.21 25 (4) | 29720 |
| RI 28.21 25 (5) | 248896 |
| RI 28.21 25 (6) | 70804 |
| RI 28.21 25 (7) | 19988 |
| RI 28.21 25 (8) | 174458 |
| RI 28.21 25 (9) | 82386 |
| RI 28.21 25 (10) | 54942 |
| RI 28.21 30 | 163736 |
| RI 28.21 30 (2) | 75992 |
| RI 28.21 30 (3) | 162548 |
| RI 28.21 30 (4) | 51976 |
| RI 28.21 31 | 163736 |
| RI 28.21 31 (2) | 75992 |
| RI 28.21 31 (3) | 162548 |
| RI 28.21 31 (4) | 51976 |
| RI 28.21 31 (5) | 390840 |
| RI 28.21 31 (6) | 62092 |
| RI 28.21 31 (7) | 306690 |
| RI 28.21 31 (8) | 385378 |
| RI 28.21 31 (9) | 160678 |
| RI 28.21 31 (10) | 32872 |
| RI 28.21 31 (11) | 8718 |
| RI 28.21 31 (12) | 77638 |
| RI 28.21 31 (13) | 23596 |
| RI 28.21 31 (14) | 96194 |
| RI 28.21 32 | 55918 |
| RI 28.21 32 (2) | 10988 |
| RI 28.21 32 (3) | 130870 |
| RI 28.21 32 (4) | 81432 |
| RI 28.21 32 (5) | 378914 |
| RI 28.21 32 (6) | 49348 |
| RI 28.21 34 | 102256 |
| RI 28.21 34 (2) | 28568 |
| RI 28.21 34 (3) | 15682 |
| RI 28.21 34 (4) | 11424 |
| RI 28.21 35 | 105068 |
| RI 28.21 35 (2) | 110724 |
| RI 28.21 37 | 100560 |
| RI 28.21 37 (2) | 109540 |
| RI 28.21 37 (3) | 38666 |
| RI 28.21 37 (4) | 6896 |

Carcinoma intraduttale papillare

| | |
|-----------------|--------|
| RI 28.21 37 (5) | 31662 |
| RI 28.21 39 | 62560 |
| RI 28.21 39 (2) | 302948 |
| RI 28.21 39 (3) | 70144 |
| RI 28.21 39 (4) | 81152 |
| RI 28.21 41 | 189580 |
| RI 28.21 41 (2) | 190368 |
| RI 28.21 42 | 71042 |
| RI 28.21 42 (2) | 25528 |
| RI 28.21 42 (3) | 53588 |
| RI 28.21 42 (4) | 129042 |
| RI 28.21 42 (5) | 17140 |
| RI 28.21 42 (6) | 171882 |
| RI 28.21 42 (7) | 52204 |
| RI 28.21 42 (8) | 60898 |
| RI 28.21 42 (9) | 82660 |
| RI 28.21 42(10) | 137166 |
| RI 28.21 43 | 42042 |
| RI 28.21 43 (2) | 103666 |
| RI 28.21 43 (3) | 61074 |
| RI 28.21 43 (4) | 56566 |
| RI 28.21 43 (5) | 84688 |
| RI 28.21 43 (6) | 98334 |
| RI 28.21 44 | 50104 |
| RI 28.21 44 (2) | 31230 |
| RI 28.21 44 (3) | 29700 |
| RI 28.21 45 | 66726 |
| RI 28.21 45 (2) | 91780 |
| RI 28.21 45 (3) | 343402 |
| RI 28.21 45 (4) | 305658 |
| RI 28.21 46 | 80516 |
| RI 28.21 46 (2) | 100366 |
| RI 28.21 46 (3) | 232278 |
| RI 28.21 46 (4) | 64448 |
| RI 28.21 46 (5) | 13012 |
| RI 28.21 46 (6) | 58764 |
| 148 5x 1 | 32126 |
| 148 5x 1 (2) | 22528 |
| 148 5x 1 (3) | 11556 |
| 148 5x 1 (4) | 33116 |
| 148 5x 2 | 17872 |
| 148 5x 2 (2) | 28406 |
| 148 5x 2 (3) | 28536 |
| 148 5x 3 | 78488 |
| 148 5x 3 (2) | 15798 |
| 148 5x 3 (3) | 18254 |
| 148 5x 3 (4) | 9898 |
| 148 5x 4 | 23626 |
| 148 5x 4 (2) | 9810 |
| 148 5x 6 | 10814 |
| 148 5x 6 (2) | 7850 |
| 148 5x 6 (3) | 22030 |
| 148 5x 6 (4) | 15586 |
| 148 5x 5 | 39978 |
| 148 5x 5 (2) | 33312 |
| 148 5x 5 (3) | 19690 |
| 148 5x 5 (4) | 29786 |
| 148 5x 5 (5) | 62590 |
| 148 5x 5 (6) | 18824 |
| 148 5x 7 | 75414 |
| 148 5x 8 | 55542 |
| 148 5x 8 (2) | 22728 |
| 148 5x 9 | 55542 |
| 148 5x 9 (2) | 22728 |
| 148 5x 9 (3) | 25586 |
| 148 5x 9 (4) | 99884 |
| 148 5x 9 (5) | 112822 |
| 148 5x 9 (6) | 16534 |

| | |
|----------------|--------|
| 148 5x 9 (7) | 19278 |
| 148 5x 10 | 32524 |
| 148 5x 10 (2) | 38878 |
| 148 5x 10 (3) | 28342 |
| 148 5x 10 (4) | 8452 |
| 148 5x 11 | 69654 |
| 148 5x 11 (2) | 15906 |
| 148 5x 11 (3) | 38444 |
| 148 5x 11 (4) | 14254 |
| 148 5x 11 (5) | 3118 |
| 148 5x 11 (6) | 11006 |
| 148 5x 11 (7) | 6690 |
| 148 5x 11 (8) | 27334 |
| 148 5x 11 (9) | 39712 |
| 148 5x 11 (10) | 33106 |
| 148 5x 11 (11) | 23950 |
| 148 5x 12 | 32448 |
| 148 5x 12 (2) | 34912 |
| 148 5x 12 (3) | 9370 |
| 148 5x 12 (4) | 72884 |
| 148 5x 13 | 15716 |
| 148 5x 13 (2) | 9580 |
| 148 5x 13 (3) | 15802 |
| 148 5x 14 | 86038 |
| 148 5x 14 (2) | 8544 |
| 148 5x 14 (3) | 45170 |
| 148 5x 14 (4) | 12136 |
| 148 5x 14 (5) | 5724 |
| 148 5x 14 (6) | 90614 |
| 148 5x 14 (7) | 25286 |
| 148 5x 14 (8) | 42142 |
| 148 5x 15 | 42742 |
| 148 5x 15 (2) | 29122 |
| 148 5x 15 (3) | 13006 |
| 148 5x 15 (4) | 7114 |
| 148 5x 15 (5) | 12694 |
| 148 5x 16 | 28188 |
| 148 5x 16 (2) | 17516 |
| 148 5x 16 (3) | 24488 |
| 148 5x 16 (4) | 21146 |
| 148 5x 16 (5) | 8368 |
| 148 5x 16 (6) | 13344 |
| 148 5x 17 | 16262 |
| 148 5x 17 (2) | 25096 |
| 148 5x 17 (3) | 7906 |
| 148 5x 17 (4) | 12904 |
| 148 5x 17 (5) | 19834 |
| 148 5x 17 (6) | 5742 |
| 148 5x 17 (7) | 7902 |
| 148 5x 17 (8) | 18974 |
| 148 5x 17 (9) | 16528 |
| 148 5x 17 (10) | 72874 |
| 148 5x 17 (11) | 38236 |
| 148 5x 17 (12) | 13890 |
| 148 5x 18 | 180498 |
| 148 5x 18 (2) | 30208 |
| 148 5x 18 (3) | 37696 |
| 148 5x 18 (4) | 121280 |
| 148 5x 18 (5) | 113356 |
| 148 5x 19 | 55052 |
| 148 5x 19 (2) | 32032 |
| 148 5x 19 (3) | 36142 |
| 148 5x 19 (4) | 28312 |
| 148 5x 19 (5) | 9126 |
| 148 5x 19 (6) | 34930 |
| 148 5x 20 | 45232 |
| 148 5x 20 (2) | 22822 |
| 148 5x 20 (3) | 79708 |

| | |
|---------------|--------|
| 148 5x 21 | 24968 |
| 148 5x 21 (2) | 21272 |
| 148 5x 22 | 56930 |
| 148 5x 22 (2) | 11140 |
| 148 5x 22 (3) | 14254 |
| 148 5x 23 | 412492 |
| 148 5x 23 (2) | 5808 |
| 148 5x 23 (3) | 10814 |
| 148 5x 23 (4) | 10868 |
| 148 5x 23 (5) | 11562 |
| 148 5x 23 (6) | 19134 |
| 148 5x 23 (7) | 92940 |