



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA



DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Dottorato di ricerca in Scienze Veterinarie

Coordinatore: Prof. Adriana Ferlazzo

Curriculum:

Scienze Cliniche

**Espressione Immunoistochimica di Mast Cell Tryptase,
Macrophage Marker, CD79a, IgA, IgG e IgM nei Tumori
delle ghiandole epatoidi e della ghiandola mammaria nel
cane.**

Tesi di:

dott. Rifici Claudia

Tutor:

Ch.ma Prof.ssa Sfacteria Alessandra

Ciclo XXIX

*L'immaginazione è più importante della conoscenza.
La conoscenza è limitata a quello che conosciamo e capiamo,
mentre l'immaginazione racchiude il mondo,
tutto quello che verrà mai pensato e capito.*

Albert Einstein.

Abstract

Immunohistochemical expression of Mast Cell Tryptase, Macrophage Marker, CD79a and immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) in the hepatoid and mammary gland tumors of dog.

According to the "field of the organization of tissues" (Toft) theory, cancer arises from deregulated interactions between cells and their stromal microenvironment. Immune cells that infiltrate tumors play decisive roles at different stages of tumor development. Among the most common canine neoplasms, the tumors of perianal glands are characterized by a mild aggressive biological behavior despite the malignancy; on the contrary canine mammary tumors are very aggressive and often metastatize.

Aim of this work is to contribute to the knowledge of the canine hepatoid gland tumors and canine mammary tumors through the assessment of stromal immune cell such as macrophages, plasmacells and mast cells.

The immunohistochemical expression for Mast cell Tryptase, Macrophage Marker, CD79 on 25 cases of hepatoid gland tumors (10 of Adenoma and 15 of Carcinoma) and on 43 cases of mammary lesions (10 hyperplasia, 10 simple carcinoma, 5 solid carcinoma , 8 micropapillary carcinoma and 10 cases of mixed carcinoma) was performed.

Each sample was tested by immunofluorescence assay to evaluate the expression of IgG, IgA and IgM. Based on the obtained results, immunofluorescence and immunohistochemistry for anti-CD 79 antibody were carried out.

Cell markers revealed the number and localization of plasmacells (PC), mast cells (MC) and macrophages (MA). In the hepatoid gland the number of macrophages and plasma cells increased in benign lesions and progressively decreased in carcinomas, while the number of mast cells was low in all the samples. In addition, in hyperplasia/adenoma CD79 epithelial positive cells were found inside the glandular lobules. Positive epithelial cells were scattered in carcinomas and epitheliomas. Anti-canine IgA, IgM and IgG were localized in PC and hepatoid cells in hyperplastic/adenomatous and cancerous cells.

Conversely in the mammary gland the number of plasmacells and macrophages decreased in hyperplastic areas, conversely characterized by the high presence of mast cells; in the malignant lesions, above all in peritumoral stroma, a mild increase in MCs number and a high increase in the number of MA and PC were observed. Rare cells were detectable in the intratumoral stroma.

An intense positivity to IgA and IgG was also detected, while the positivity for IgM was weak or absent. Moreover, the positivity for the antibody anti Cd79a, both at immunofluorescence and immunohistochemistry, was located in the basal cells of the solid tumors and in glandular cells of simple and micropapillary carcinomas.

Stromal immune components support cancer initiation, progression and metastasis. We found an increased number of MC, PC and MA in neoplastic lesions of hepatoid gland and mammary gland.

Moreover, we found Immunoglobulins (Igs) and CD79 both in neoplastic hepatoid glands and canine mammary tumors.

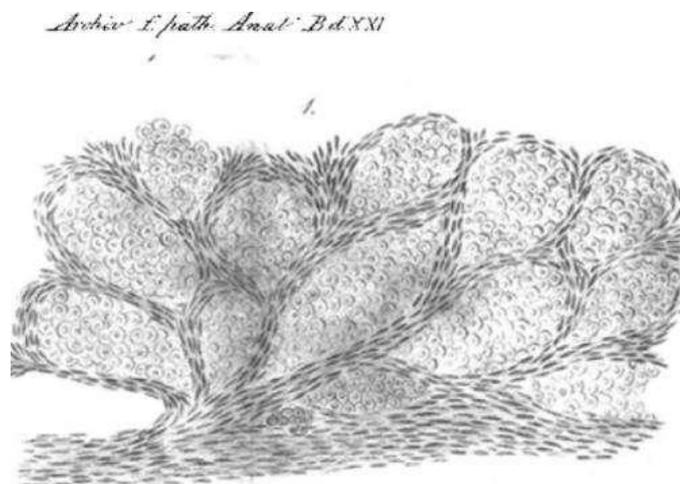
Immunoglobulins, known also as antibody, traditionally are considered as an exclusive product of B cells. These molecules recognize and neutralize pathogens and other cells considered "non-self". They play a crucial role in the regulation of the immune system mechanisms. Noteworthy, in the last decades, has been highlighted that many physiological and pathological "non B" cells, including epithelial cells, gametes, endothelial cells, cardiomyocytes and neurons may also express Igs (i.e., IgA, IgG and IgM). Even if several authors demonstrated the presence of Igs in human epithelial tumor, the role of these molecules and their clinical significance in the development of oncological disease it is still unknown as well as their eventual use in the therapeutic approach to cancer remains to be explored.

CD79 and Igs have been found in human cancerous cells and their role in cancerogenesis has being raising interest in recent years.

On the basis of our preliminary results and literature data, we suggest that such cells and molecules could have a role in local immune responses and could be directly involved in the biology of hepatoid gland tumor. Anti-canine IgA and IgM immunofluorescence revealed positivity of hepatoid cells both in hyperplastic/adenomatous and cancerous cells. Immunoglobulin and CD79 immunostain are strongly suggestive of the involvement of hepatoid glands in local defensive mechanism of the skin yet their role in cancer progression should not be excluded. Overall, the obtained data showed that research need to be more addressed to understand the function of hepatoid gland and the biology of hepatoid gland tumor.

The presence of IgA, IgG and IgM has been demonstrated in the woman breast cancer and several scientific evidences underline the correlation between the expression of these molecules and the proliferation or the regression of the cancer. The Igs expressed by breast cancer, as well as other epithelial tumors, may be used as a prognostic and therapeutic cancer marker. In fact, recently, in humans the cancer immunotherapy has been investigated by several groups of researchers. Numerous studies investigate the production of monoclonal antibodies as a potential personalized therapy for cancer. These monoclonal antibodies are active against both tumor and stromal microenvironment. The present study investigate the expression of Immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) in the neoplastic epithelium of dog mammary glands. The result herein reported on Ig positivity, are consistent with those stated for the woman breast cancer. Therefore a canine tumor, already recognized as a study model in comparative oncology, represents an important support, also, for the study of innovative treatments such as personalized immunotherapy.

Introduzione



Virchows Archiv, European Journal of Pathology 1861. Riproduzione in camera lucida rappresentante cellule tumorali all'interno degli alveoli polmonari.

Teorie sulla Carcinogenesi

Il cancro, nonostante la cospicua attività di ricerca, continua a essere una malattia poco conosciuta ed estremamente complessa, soprattutto dal punto di vista patogenetico.

Differenti teorie sulla carcinogenesi sono state formulate, tuttavia queste non hanno spiegato del tutto le complesse interazioni che determinano l'insorgere dei fenomeni neoplastici, limitando così la formulazione di approcci terapeutici mirati.

Di seguito vengono passate in rassegna le principali teorie carcinogenetiche universalmente riconosciute.

Teoria della Mutazione Somatica (SMT)

La teoria della mutazione somatica (SMT) proposta dal biologo tedesco Theodor Boveri nel 1914, per quasi un secolo è stata l'ipotesi carcinogenetica prevalente, secondo questa il cancro deriverebbe dal progressivo accumulo di mutazioni geniche a partire da una singola cellula normale che diventa cancerosa a seguito di arrangiamenti che avvengono nella cromatina nucleare (Boveri, 1914; Boveri, 1929; Triolo, 1964).

La SMT si basa su due assunti fondamentali: (1) il cancro è una malattia "cell-based" dove una cellula normale nel tempo accumula mutazioni casuali che influenzano il controllo della sua proliferazione, diventando così tumorale e (2) che le cellule sono in uno stato di "quiescenza proliferativa" (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

Tuttavia, verso la fine del secolo scorso, la sempre maggiore conoscenza del controllo della proliferazione cellulare e della biologia dello sviluppo ha evidenziato alcuni aspetti della carcinogenesi che non vengono contemplati dalla SMT rivelando, così, alcune carenze di questa teoria.

Per colmare queste lacune della SMT, sono state proposte una serie di varianti ad hoc pur mantenendo inalterata l'idea che il cancro è una malattia "cell-based".

Tra queste varianti quella che ha ricevuto notevole attenzione è la teoria delle cellule staminali cancerose (CSC), secondo cui la cellula neoplastica, a seguito di varie mutazioni, evolve verso lo stato immaturo di cellula staminale.

Tuttavia bisogna sottolineare che, come sostenuto da Conrad Waddington (il biologo che ha coniato il termine di "cellula staminale"), l'epigenesi viene intesa come controllo

temporale e spaziale dello sviluppo embrionale che non avviene a causa di cambiamenti nella sequenza di DNA delle cellule coinvolte in questo processo (Waddington, 1935).

Mentre, considerando il contesto della SMT, le alterazioni epigenetiche sono strettamente legate a mutazioni del DNA cellulare come, la metilazione del DNA e modificazioni degli istoni.

Per accreditare la variante CSC, i suoi sostenitori giustificano la conversione delle cellule non staminali in staminali, e viceversa, con la notevole plasticità del processo cancerogeno.

Un'ulteriore variante della SMT ipotizza invece che gli eventi cancerogeni sono guidati da proteine intrinsecamente disordinate (IDP) che sarebbero in grado, grazie alla loro flessibilità, di indurre una trasformazione cellulare nel tentativo di adattarsi ad ambienti perturbati.

Ciò nonostante, una conseguenza indesiderata di queste teorie sulla carcinogenesi, SMT e le sue varianti, che si traduce in un'inevitabile carenza, è l'incapacità degli scienziati di adempiere ad uno degli scopi fondamentali esplicativi delle teorie, ovvero, le teorie scientifiche devono essere verificate, testate e soggette alla possibilità di rifiuto e, di conseguenza, scartate (Ayala 1968).

Sulla base di queste considerazioni, per tutta una serie di fatti discordanti e molti altri paradossi che sono stati ignorati, Weinberg, inizialmente attivo sostenitore della teoria SMT, ha recentemente messo in discussione l'intero costrutto teorico della SMT e delle sue varianti, per la mancanza di risultati significativi, che possano sufficientemente spiegare l'inizio e lo sviluppo del cancro.

Infatti, gli attuali approcci terapeutici, basati su questo paradigma, hanno dimostrato di essere inefficaci nella gestione clinica del cancro e nella sopravvivenza a lungo termine del paziente (Weinberg, 2014).

La credibilità acquisita dalla SMT è attribuibile al ruolo sempre più importante riconosciuto alla ricerca genetica nel XX secolo; ciò nonostante, la moltitudine di mutazioni geniche riscontrate, nelle varie tipologie neoplastiche, piuttosto che semplificare ha reso più complessi i meccanismi interpretativi alla base della carcinogenesi che risulta sempre più inscindibile da altre componenti, cellulari ed extracellulari (ad esempio matrice), co-determinanti nell'evoluzione del fenotipo neoplastico.

Tuttavia, nonostante le sue carenze, le ricerche sulla SMT hanno permesso di comprendere ed esplorare i meccanismi di base delle cellule cancerogene, portando a "benefici collaterali" quali la conoscenza più dettagliata dei fenomeni intracellulari per es.: replicazione del DNA, trascrizione, funzioni degli organelli intracellulari, trasduzione del segnale, etc. (Sonnenschein, 2014).

Teoria dell'Organizzazione dei tessuti (TOFT)

Nonostante l'egemonia della SMT, durante quasi tutto il XX secolo, lo stesso Boveri mostrava perplessità applicative della sua teoria nei confronti della patogenesi del cancro, sostenendo che "è impossibile osservare il processo del cancro nel suo *statu nascendi*" (Boveri, 1914).

Le carenze della SMT hanno spronato i ricercatori a postulare teorie alternative per lo studio della carcinogenesi.

Infatti, già nel 1936, Conrad Waddington e John Needham, riprendendo quello che era il punto di vista dominante nel tardo XIX secolo tra patologi tedeschi, ovvero il cancro come malattia basata sui tessuti, hanno focalizzato la loro attenzione sul fatto che il cancro potrebbe essere considerato un processo simile ad uno sviluppo anormale e che quindi bisognerebbe valutare l'insieme tissutale e non la singola cellula (Waddington 1935; Needham 1936).

Successivamente, nel 1999, Sonnenschein e Soto hanno proposto una valida alternativa alla SMT, ovvero la teoria di “campo dell’organizzazione dei tessuti” (TOFT) secondo cui il cancro nasce dalla deregolamentazione delle interazioni tra le cellule e il loro microambiente (Sonnenschein e Soto, 1999).

Da allora, questa teoria sfida l'egemonia del SMT per spiegare il cancro mediante l'adozione di una prospettiva organicista (o basata a livello di organizzazione biologica) piuttosto che su mutazioni genetiche della singola cellula.

La principale differenza tra queste due teorie risiede nel fatto che, a differenza della SMT, secondo la TOFT il cancro è una malattia che parte dai tessuti, e che i carcinogeni (direttamente) e le mutazioni della linea germinale (indirettamente) possono modificare le normali interazioni tra lo stroma e le cellule parenchimali adiacenti (Bizzarri and Cucina, 2014).

Per spiegare la carcinogenesi la TOFT si basa su due distinte premesse: (1) il cancro è una malattia che origina dal tessuto (tissue-based theory), simile al processo di morfogenesi che avviene durante lo sviluppo embrionale (cancro: sviluppo andato storto), e (2) la proliferazione e la motilità sono lo stato di default tutte le cellule.

Queste due premesse confutano quelle della teoria della SMT che postula invece che il cancro è una malattia basata sulle mutazioni delle singole cellule (cell-based theory) e che lo “stato di default” è la quiescenza negli organismi unicellulari.

Pertanto, interazioni anomale croniche nel microambiente, tra mesenchima / stroma e parenchima, sarebbero responsabili della comparsa di un tumore.

Infatti, secondo la teoria TOFT la carcinogenesi, come la morfogenesi, è un complesso processo di organizzazione e interazioni tra diverse cellule e tessuti come avviene, appunto, durante istogenesi e organogenesi nello sviluppo embriologico di organi come mammella e rene (Soto e Sonnenschein,2011).

Infatti, ad esempio, durante lo sviluppo del rene le interazioni tra i suoi due tessuti precursori, la gemma ureterale e il mesenchima metanefrogeno generano l'induzione reciproca tra il sistema di raccolta (derivato dalla gemma ureterale) e quello del nefrone (derivato dal mesenchima metanefrogeno); nessuno di questi tessuti, in assenza dall'altro, può generare un rene funzionante (Gilbert e Sarkar, 2000).

Allo stesso modo nella morfogenesi della ghiandola mammaria, la componente cellulare, costituita dalle cellule epiteliali, dotata della capacità di muoversi e proliferare, è vincolata da una componente meccanico-fisica, una matrice di fibre collagene, che permette e regola la sua differenziazione in formazioni duttali e acinari; infatti, si è riscontrato che ad un eccesso di rigidità del tessuto potrebbe conseguire la formazione di strutture irregolari incapaci di formare un lume, o al contrario, un allentamento di tali vincoli tissutali potrebbe comportare una eccessiva proliferazione dalla componente epiteliale (Paszek et al., 2005).

Da questi e vari altri esempi di organogenesi (polmone, ghiandole salivari, denti, ecc), si può dedurre come le relazioni tra le diverse componenti di un organo non possono essere ridotte a eventi sub-cellulari ma sono regolate da complesse interazioni e vincoli tra cellula-cellula e cellule-tessuti e che una qualsiasi alterazione tra questi normali vincoli, come l'eccessiva rigidità o l'allentamento dei tessuti, comporta anomalie nell'organizzazione biologica che, se persistenti, portano alla carcinogenesi (Sonnenschein, 2016).

All'interno di questa prospettiva, ciò che conta sia nella morfogenesi e carcinogenesi non sono solo le molecole, ma anche le forze biofisiche generate da cellule e tessuti; da ciò si deduce che tali processi avvengono nei tessuti, organi e organismi di entrambi gli individui sia normali che malati, inclusi i pazienti affetti da cancro (Ying et al., 2008; Wray et al., 2010).

Prendendo in considerazione, dunque, il principio di organizzazione, è stato ipotizzato che la carcinogenesi può essere spiegata come un problema relazionale in cui la variazione dei vincoli creati da interazioni delle cellule e forze fisiche generate dal microambiente tissutale, consente alle cellule di riguadagnare il loro stato di default, proliferazione e motilità (Sonnenschein, 2016).

Inoltre, il "*corollario*" della TOFT è che la carcinogenesi è un processo reversibile e bidirezionale (Soto et al., 2013), in netta contraddizione con il messaggio implicito della SMT, che "una volta che una cellula è tumorale, sarà sempre una cellula tumorale" (Pierce et al., 1978) e le mutazioni genomiche in una singola cellula non possono essere "riparate",

Esperimenti condotti da diversi ricercatori hanno dimostrato, infatti, che tessuti normali trapiantati in posizioni "sbagliate" inducono la trasformazione neoplastica, mentre tessuti tumorali sono in grado di "normalizzarsi" se innestati in un tessuto normale; ad

esempio, cellule derivate da un embrione possono generare neoplasie se posizionate al di fuori del loro habitat normale, come embrioni precoci posizionati all'interno del testicolo o nel peritoneo, mentre quando queste cellule neoplastiche sono collocate in un microambiente normale riacquistano il loro fenotipo normale (Soto e Sonnenschein, 2011).

Altri esempi di “normalizzazione” includono cellule di melanoma altamente maligno iniettato in embrioni di zebrafish (Kasemeier-Kulesa et al., 2008), cellule di epatocarcinoma iniettate nel fegato normale (McCullough et al., 1997) e cellule di carcinoma embrionale o mammario iniettate nel microambiente normale della ghiandola mammaria; in quest'ultimo caso, le "cellule tumorali "si sono differenziate in cellule luminali, mioepiteliali ed epiteliali secretorie confermando che il normale microambiente può interamente sopprimere il fenotipo neoplastico mediante rigenerazione ghiandolare (Maffini et al., 2005; Bussard et al., 2010).

Inoltre, è stato dimostrato che le cellule stromali di un microambiente trattato con un cancerogeno (N-nitroso-metil-urea), possono guidare la trasformazione maligna di cellule epiteliali, mentre trattando direttamente le cellule epiteliali non avviene alcuna trasformazione cancerosa (Maffini et al.,2004).

La capacità proliferativa e la motilità delle singole cellule somatiche dipenderà, quindi, dalle componenti che abitano il microambiente e che necessariamente interagiscono con quelle neoplastiche (Bizzarri and Cucina, 2014; Sonnenschein, 2016).

Teoria TOFT e Metastasi

Le spiegazioni patogenetiche sulla formazione di metastasi hanno incontrato ostacoli simili a quelli dei meccanismi carcinogenici dei tumori primari (Sonnenschein, 2014). Le ricerche condotte sulle metastasi, così come quelle sulla carcinogenesi, sono state incentrate sulla nozione che una singola "cellula tumorale" è dotata di tutte le proprietà della malattia.

Infatti, dal punto di vista della SMT sarebbero ulteriori mutazioni nelle cellule del tumore primario a guidare la proliferazione in alcuni organi rispetto ad altri, sebbene queste mutazioni, specifiche delle metastasi, non sono state ancora documentate e comprovate da evidenze scientifiche (Weinberg, 2014). Negli ultimi anni si è tentato anche di spiegare la metastatizzazione come un processo darwiniano di selezione naturale (synthesis moderna); in quest'ottica, infatti, le cellule tumorali singole diventerebbero soggette ad un processo naturale selettivo in cui, spontaneamente o per induzione (attraverso il trattamento), la più "adatta" tra di loro sopravvive, si replica e guida la progressione del processo neoplastico sino alla morte dell'ospite colpito (Laland, 2014).

Secondo la teoria TOFT, le cellule si spostano da un tumore primario ad altre destinazioni, vicine o lontane, in primo luogo, a causa dei vincoli tissutali allentati che permettono loro di esprimere lo stato di default, vale a dire la proliferazione e la motilità, e in secondo luogo perché le cellule tumorali sono in grado di riconoscere un "ambiente ostile" all'interno dell'organizzazione tissutale del tumore primario, ad esempio la mancanza di nutrienti e ossigeno. Quest'ultima condizione potrebbe stimolare le cellule a muoversi in cerca di un ambiente nutrizionale ottimale in cui le condizioni meccaniche e fisico-chimiche siano favorevoli alla proliferazione e alla migrazione delle cellule tumorali.

Diverse evidenze sperimentali corroborano tali ipotesi come, ad esempio, le prove di De Groot e collaboratori (2010) che hanno dimostrato che la somministrazione in glioblastomi di bevacizumab (Avastin), farmaco bloccante l'angiogenesi, è stata inaspettatamente seguita da un comportamento altamente infiltrante di cellule tumorali in questi pazienti. Inoltre, sembra che singole cellule epiteliali tumorali circolanti hanno possibilità limitate di formare metastasi, probabilmente a causa delle influenze "normalizzanti" del tessuto (o l'organo) in cui tali singole cellule migrano (De Groot et al., 2010)

Infatti, come osservato da Friedl e collaboratori (2011), il processo metastatico è dovuto ad una migrazione multicellulare collettiva e non di singole cellule, qualitativamente paragonabile a ciò che accade durante il normale sviluppo tissutale e durante la migrazione delle cellule staminali emopoietiche (Friedl et al., 2010).

Dunque questi "emboli metastatici" non sono altro che frammenti rilasciati dal tumore primario, legati tra loro da giunzioni cellula-cellula e contenenti stroma del tessuto di origine, che si diffondono attraverso i vasi sanguigni o linfatici per raggiungere il sito metastatico.

Infatti, sono proprio alcune caratteristiche isto-patologiche delle metastasi che consentono ai patologi di riconoscerne la fonte primaria; ad esempio, le metastasi del cancro al seno in altri organi come cervello, fegato, polmoni e ossa, presentano un'isto-architettura simile alla ghiandola mammaria e presentano cellule stromali del tumore primario (Duda et al., 2010).

Le metastasi diventano, così, il risultato di un ancoraggio delle cellule tumorali parenchimali e del loro microambiente stromale, ed è proprio quest'ultimo a svolgere un ruolo

importante nel determinare se le cellule neoplastiche, migrando, saranno in grado o meno di ristabilire il fenotipo del tumore primario (Sonnenschein et al., 2015).

Pertanto, le cellule tumorali non solo hanno bisogno di promuovere la propria immortalità ed invadere territori propri, ma hanno anche bisogno di evolversi insieme con il microambiente e di trovare strategie che consentano loro di sopravvivere e sfuggire alla sorveglianza immunitaria (Martin et al., 2015).

Microambiente e Tumore

Il termine "microambiente", oltre alle cellule tumorali, comprende un insieme di elementi che interagiscono tra loro, come cellule endoteliali, fibroblasti, cellule staminali (mesenchymal stromal/StemCells (MSC)), e varie cellule del sistema immunitario, che insieme a citochine e fattori di crescita, sono incorporate in uno stroma definito, appunto, tumorale, dotato di specifiche proprietà fisiche (pressione di ossigeno) e biomeccaniche.

Fibroblasti e cellule endoteliali normalmente costituiscono una parte del parenchima del tessuto prima della comparsa della tumorigenesi, mentre le cellule immunitarie, tra cui cellule T e B, macrofagi e mastociti, derivate dal midollo osseo, possono trovarsi in loco o essere reclutate dopo l'inizio della tumorigenesi (Bizzarri and Cucina, 2014; Isaac et al., 2015).

Il microambiente, attraverso le sue componenti fisiche, partecipa a promuovere e dare forma al processo di cancerogenesi che, secondo la teoria TOFT, può essere considerato come uno "sviluppo andato storto"; nel contempo il microambiente può anche avere un effetto "normalizzante" sulle cellule tumorali, confermando la reversibilità del processo neoplastico (Sonnenschein, 2012).

Quindi, l'interazione tra le cellule tumorali e il loro microambiente guida i processi di differenziazione e contribuisce in modo determinante alla comparsa del cancro.

Interazioni bidirezionali, che avvengono nel microambiente svolgono un ruolo cruciale in ogni fase dello sviluppo del tumore: nell'iniziazione della trasformazione oncogenica, nell'angiogenesi, nella fuga dalla sorveglianza immunitaria, nel processo di metastatizzazione,

nella sopravvivenza delle cellule tumorali e nella resistenza a radio- e chemioterapia (Sharma 2016).

Sulla base di queste premesse appare necessario conoscere meglio le relazioni tra le diverse componenti del microambiente e le cellule tumorali e il loro rapporto con la progressione del tumore e il loro ruolo nella formazione di metastasi, al fine di sviluppare strategie migliori per nuove terapie anti-cancro (Isaac et al., 2015; Trivanovic et al., 2016).

Microambiente, Immunoediting e Cancro

Sebbene già Virchow, nel 1863, avesse intuitivamente svelato l'importante ruolo del microambiente tumorale e del suo infiltrato di cellule infiammatorie, solo da circa un ventennio i ricercatori hanno focalizzato l'attenzione sulla progressione tumorale come fitta rete di interazioni, tra le cellule tumorali e lo stroma circostante, in un dinamico cross-talk capace di modulare anche il sistema immunitario, innato e adattativo, da parte delle cellule tumorali.

Le cellule tumorali, infatti, sono in grado di interferire con i meccanismi di immunomodulazione, mediante attivazione o inibizione di cellule immunitarie, secernendo mediatori solubili e manipolando quella che è la capacità del sistema immunitario di ottenere una risposta antitumorale (Elinav et al., 2013).

Capire come il sistema immunitario intervenga nello sviluppo e progressione del cancro è uno dei quesiti più complessi in immunologia.

Il concetto di sorveglianza immunitaria contro i tumori è stato investigato già nel 1909 da Paul Ehrlich il quale ipotizzò che le difese dell'ospite possano impedire la proliferazione di cellule neoplastiche affermando che: nel corso enormemente complicato dello sviluppo fetale e post-fetale, cellule aberranti diventano insolitamente comuni. Fortunatamente, nella maggior parte delle persone, rimangono completamente latenti grazie a meccanismi positivi dell'organismo (Ehrlich, 1909).

Circa 50 anni più tardi, Foley (1953) e Burnet (1970) ipotizzarono che le cellule tumorali, per la presenza di neo-antigeni, inducono una reazione immunologica contro il

cancro stesso e sulla base di questa ipotesi è stata formulata la teoria della sorveglianza immunitaria (Foley, 1953; Burnet, 1970).

A questa teoria non hanno fatto seguito ulteriori ricerche e soltanto nel 2002, Schreiber sviluppa il concetto di “Cancer Immunoediting”, ovvero quel processo in cui le cellule tumorali modulano costantemente la risposta antitumorale.

Durante questo processo, l'equilibrio tra l'immunità antitumorale e quella pro-tumorale può essere inclinato per proteggere contro lo sviluppo della neoplasia o, al contrario, per sostenere la crescita del tumore (Dunn et al., 2002).

L'Immunoediting si compone di tre fasi: (1) una prima fase di eliminazione (immunosorveglianza), dove le cellule tumorali vengono uccise da NK, CD4 + e CD8 +; (2) una seconda di equilibrio, che si instaura tra cellule immunitarie e tumorali e (3) infine una terza fase, che corrisponde alla fase di fuga, quando il sistema immunitario non è in grado di distruggere il tumore e si conclude con la comparsa di tumori clinicamente rilevabili.

La fase di fuga è caratterizzata dalla selezione di varianti tumorali meno immunogene con la perdita di espressione di antigeni tumorali, da una sovraregolazione della resistenza contro le cellule tumorali e/o un aumento dell'espressione di geni pro-sopravvivenza, e infine dallo sviluppo di un microambiente tumorale immunosoppressivo (Dunn et al., 2004).

Inoltre, sembrerebbe che il sistema immunitario svolga un doppio ruolo nel cancro; infatti, non solo è in grado di sopprimere la crescita tumorale mediante meccanismi di immunosorveglianza portando a distruzione delle cellule tumorali o inibendo la loro proliferazione, ma anche di promuovere la progressione del tumore, talvolta generando tumori più aggressivi.

Pertanto i tumori per sopravvivere e metastatizzare devono eludere il sistema immunitario.

Tuttavia i meccanismi che portano all'immunoediting del tumore e la loro evasione dalla sorveglianza immunitaria sono tutt'altro che chiari.

La prima linea di difesa contro l'invasione metastatica è il sistema immunitario innato che fornisce la difesa immediata seguito dai sistemi di difesa adattativi attraverso l'immunità umorale e cellulo-mediata; mastociti, neutrofili, macrofagi e altre cellule di derivazione mieloide che inizialmente proteggono l'organismo, successivamente, rimodulano il microambiente favorendo la progressione neoplastica e il processo metastatico.

Dunque, lo sviluppo del tumore e le metastasi sono influenzati da modificazioni proprie dello stroma e dalla popolazione cellulare tipica del sistema immunitario innato e adattativo.

Comprendere i meccanismi dell'immunosorveglianza tumorale e il ruolo delle singole cellule immunitarie del microambiente, potrebbe guidare verso una terapia contro il cancro basata su approcci immunomodulatori (Martin et al., 2015; Ribatti, 2016).

Macrofagi (TAMs) e Tumori

Nel microambiente tumorale il sistema immunitario interviene, principalmente negli stadi iniziali, attraverso le cellule del sistema innato quali macrofagi e mastociti, la cui prevalenza dell'uno o dell'altro tipo dipende dal tipo di tumore, e cellule del sistema acquisito in particolare linfociti T.

Nonostante numerosi dati suggeriscono una prognosi migliore quando nel tumore vi è infiltrazione di cellule T CD8+, in alcuni tipi di cancro non ci sono prove che il microambiente locale debba essere necessariamente immunosoppressivo; infatti, la presenza e la funzione delle cellule immunitarie nei tumori, a volte, risulta essenziale nell'acquisizione di un fenotipo maligno.

Tra le cellule immunitarie, innate e adattative, reclutate nei siti tumorali, i macrofagi (TAMs) sono presenti in tutte le fasi di progressione del tumore e sembra possano assumere un ruolo centrale nel dialogo che avviene tra le cellule del microambiente e quelle tumorali ed è stato dimostrato che, talvolta, un loro aumento sia correlato con una prognosi infausta (Krol et al., 2014).

I macrofagi sono cellule del sistema immunitario, si trovano in tutti i tessuti del corpo, dove la loro principale funzione è quella di fagocitare cellule apoptotiche e gli agenti patogeni, e di stimolare la produzione di altre molecole effettrici del sistema immunitario.

Queste cellule sono dotate di notevole plasticità e possono cambiare il loro fenotipo funzionale a seconda degli stimoli ambientali che ricevono: i macrofagi possono aumentare l'infiammazione e stimolare il sistema immunitario, oppure, anche svolgere un ruolo anti-infiammatorio importante e diminuire reazioni immunitarie attraverso il rilascio di citochine. (Beirão et al., 2015).

I monociti reclutati nel microambiente tumorale possiedono la capacità di differenziarsi in una delle due linee di macrofagi maturi (M1 e M2) in base alle citochine presenti nello stroma tumorale: i macrofagi che vengono attivati da interferone gamma (IFN- γ) sono chiamati M1 e hanno azione pro-infiammatoria, mediante meccanismi di fagocitosi ed

effetti citotossici inibiscono la progressione del tumore (Enzler et al., 2009); mentre quelli attivati da citochine, quali IL-4 e IL-13, si definiscono M2 e svolgono un' azione anti-infiammatoria, promuovono la riparazione dei tessuti, l'angiogenesi, producono citochine che sopprimono il sistema immunitario adattativo e aumentano la resistenza agli stimoli apoptotici, sostenendo in tal modo la progressione del tumore (Grivennikov et al., 2010)

Generalmente i macrofagi infiltranti i tumori (TAMs) possiedono un fenotipo M2 sebbene forme di transizione dei macrofagi M1/M2 possono coesistere durante la progressione del tumore (Beirão et al., 2015).

Inoltre i TAMs producono, e ne stimolano la produzione in altre cellule immunitarie, un ampio repertorio di fattori di crescita, quali il fattore di crescita endoteliale (EGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e il fattore di crescita trasformante (TGF- β), quest'ultimo responsabile della conversione dei macrofagi dal fenotipo M1 a M2, vari fattori immuno-soppressivi, tra cui prostaglandina E2 (PGE2), indolamina 2, 3-diossigenasi (IDO), interleuchina 10 (IL-10) e alcune molecole proteolitiche come plasmina, urochinasi attivatore del plasminogeno (UPA), catepsina B e metalloproteasi della matrice (MMP) che contribuiscono al rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) (Wang et al., 2011).

Numerosi studi dimostrano che i macrofagi piuttosto che avere azione tumoricida, spesso adottano un fenotipo pro-tumorale sia nel sito primario, stimolando l'angiogenesi, l'invasione vasale, la proliferazione e la motilità delle cellule tumorali, sia in quelli metastatici promuovendo lo stravasamento delle cellule tumorali, la sopravvivenza e la crescita persistente (Grivennikov et al., 2010; Biswas et al., 2014).

All'interno dei tumori, l'attività citotossica dei macrofagi M1 viene inibita mediante il rilascio di una serie di fattori, tra cui IL4 sintetizzata dalle cellule T CD4 + e / o dalle cellule tumorali e fattori di crescita come il fattore di crescita trasformante- β 1 (TGF- β 1) (De Nardo et al., 2009) che, nello stesso tempo, rimodellando il microambiente tumorale, provocano la ripolarizzazione dei macrofagi residenti nel fenotipo M2 contribuendo alla progressione del tumore (Noy and Pollard, 2014).

Recenti studi clinici e protocolli sperimentali, hanno dimostrato che i macrofagi possono essere "educati" dal microambiente tumorale al fine di adottare un ruolo trofico che possa facilitare l'angiogenesi, la progressione dei tumori solidi e le metastasi (Pollard et al., 2004; Qian and Pollard, 2010).

I macrofagi "educati" presentano fenotipo M2 e possono diventare vantaggiosi per la crescita tumorale in vari modi: (1) in condizioni di ipossia, i macrofagi producono molecole angiogeniche come VEGF, fattori di crescita epidermici (EGF), TNF- α , fattore di crescita dei fibroblasti, timidina fosforilasi (TP) e varie chemochine che stimolano l'angiogenesi nei tessuti tumorali e favoriscono l'ossigenazione e l'apporto di sostanze nutritive alle cellule neoplastiche; (2) mediante produzione di molecole immunosoppressive, tra cui PGE2, TGF- β , e IL-10, con lo scopo di sopprimere l'azione immunitaria antitumorale mediata dalle cellule T e dalle natural Killer sia durante la progressione tumorale e anche dopo la somministrazione di chemioterapici o immunoterapici ; (3) i TAM-M2 sono coinvolti anche nel mantenimento della sopravvivenza delle cellule staminali del cancro, nella promozione della crescita tumorale e svolgono un ruolo fondamentale nel processo di invasione metastatizzazione

mediante la produzione di metalloproteinasi della matrice (MMP), come MMP2 e MMP9 che degradano la matrice extracellulare (Paolino and Penninger , 2015).

Inoltre, vari fattori di crescita, ed in particolare il TGF- β 1, oltre a favorire l'educazione dei TAM da parte delle cellule tumorali, rivestono notevole importanza nel processo di metastatizzazione .

TGF- β 1 è una citochina infiammatoria capace di indurre la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), fenomeno di notevole importanza nell' iniziazione della cascata metastatica, in quanto fornisce alle cellule tumorali proprietà migratorie, staminali e di invasività.

Ad oggi, però, rimane ancora poco conosciuta la modalità di diffusione nei vasi linfatici e sanguigni delle cellule EMT.

Infatti, il termine "mesenchimali" è una definizione piuttosto aspecifica, se da un lato le cellule EMT possono essere ascrivibili morfologicamente a fibroblasti, dall'altro, con questa accezione, non è possibile spiegare a pieno le proprietà pro-metastatiche, come la capacità migratoria e il carattere invasivo delle cellule EMT, che gli consentono di diffondersi attraverso i vasi e tessuti; infatti, fibroblasti o altri tipi di cellule mesenchimali normali non possiedono tali capacità, mentre le uniche cellule che effettivamente diffondono nell'organismo in modo simile alle cellule tumorali sono le cellule del sistema immunitario, altamente specializzate nella migrazione attraverso linfatici, vasi sanguigni e compartimenti tissutali (Yu et al., 2013)

Partendo da questa considerazione Jonasson e collaboratori (2015) hanno dimostrato che le cellule tumorali in fase di EMT in risposta a TGF- β 1 acquisiscono peculiarità tipiche

delle cellule immunitarie, in particolare di quelle ematopoietiche derivate da precursori mieloidi. Sono stati identificati cluster di geni EMT-indotti da monociti, macrofagi, mastociti e cellule dendritiche mieloidi ma non da cellule B, cellule T, altri tipi di cellule dendritiche o granulociti; tali cluster sono stati identificati soprattutto nei carcinomi mammari a cellule basali B, cellule meno differenziate rispetto alle cellule luminali e alle cellule basali A, e nei tumori mammari negativi per i recettori per gli estrogeni e progesterone, considerati il tipo più aggressivo e meno differenziato tra i tumori mammari nella donna (Johansson et al., 2015).

Mastociti (TAMCs) e Tumori

Nonostante la loro scoperta risalga a oltre 100 anni fa, i mastociti rappresentano ancora oggi un enigma biologico, in quanto sono onnipresenti nei tessuti e possiedono una serie di risorse biochimiche e funzionali che li pone al centro non solo di reazioni infiammatorie e risposte immunitarie, ma anche di meccanismi di regolazione omeostatica dei tessuti in generale, compresi i fenomeni neoplastici (Ribatti, 2013).

I mastociti (MCS) sono cellule del sistema emopoietico derivanti da cellule staminali mieloidi e fanno parte del sistema immunitario innato; noti per il loro ruolo nelle allergie e anafilassi, i MCS svolgono anche un importante ruolo di protezione, essendo intimamente coinvolti nella guarigione delle ferite e nella difesa contro gli agenti patogeni.

A differenza di altre cellule di origine ematopoietica, che vengono rilasciate nel flusso sanguigno principalmente in uno stato maturo identificabile, i mastociti migrano come cellule progenitrici immature attraverso il flusso sanguigno e arrivano ai tessuti periferici dove, grazie al legame tra il fattore di crescita delle cellule staminali (SCF) e il suo recettore KIT, si innesca una cascata di segnali che promuove la loro proliferazione, maturazione e sopravvivenza (Dahlin, 2014).

Da ciò si deduce che il loro fenotipo e funzione, sembra essere controllata in modo tessuto-specifico, sia in condizioni normali che patologiche, attraverso alcune integrine, molecole di adesione, chemochine e loro recettori, citochine e fattori di crescita presenti nel microambiente, che diventa, dunque, responsabile in ultima analisi del loro fenotipo maturo (da Silva et al., 2014).

Grazie al loro elevato grado di eterogeneità e plasticità, una volta raggiunta la maturità, i mastociti hanno la capacità di interagire prontamente con il microambiente attraverso il rilascio di una serie di mediatori biologicamente attivi, con effetti positivi o negativi su varie cellule bersaglio, talvolta alterando quel delicato equilibrio che può provocare effetti devastanti per l'organismo; infatti, segnali errati nel microambiente possono destabilizzare l'omeostasi dei tessuti e alterare la normale barriera, garantita da un tessuto normale, avviando la tumorigenesi (Siebenhaar et al., 2014).

Paul Ehrlich, che nel 1879 per primo descrisse i MCS, e successivamente Westphal nel 1891, dimostrarono un incremento marcato di MCS nei tessuti circostanti di vari tumori maligni; tuttavia solo dopo quasi cento anni, grazie a Riley (1968), è stata nuovamente posta attenzione sul ruolo di queste cellule e sulla loro funzione immunologica durante lo sviluppo del tumore.

Oggi, grazie all'interesse da parte dei ricercatori sulle interazioni delle cellule tumorali con il loro microambiente, è stato confermato che i mastociti associati al tumore (TAMCs) rappresentano una componente del lungo elenco dell'infiltrato immunitario stromale dei tumori solidi.

I TAMCs, presenti nel microambiente tumorale, vengono attivati sia per contatto diretto che mediante altri meccanismi quali: (1) rilascio di mediatori pro-tumorali da parte delle cellule neoplastiche, come il fattore delle cellule staminali (SCF) che agisce sui recettori specifici c-Kit presenti sui mastociti; (2) tramite mediatori contenuti nei granuli secretori degli stessi mastociti; (3) mediante condizioni sfavorevoli del microambiente quali l'ipossia o, infine (4) grazie alla presenza di altre molecole attivanti prodotte dalle cellule del sistema

immunitario, comprese le catene leggere delle immunoglobuline (free light chain, FLC) rilasciate dalle plasmacellule (Varicchi et al., 2016).

Dopo l'attivazione i TAMCs sono in grado di rilasciare nel microambiente tumorale molecole in grado di influenzare la crescita tumorale, come i mediatori preformati conservati nei loro granuli pronti per il rilascio immediato (ad esempio triptasi, chimasi, e altre proteasi) o quelli sintetizzati ex novo (ad esempio mediatori lipidici, citochine, chemochine e fattori angiogenici). I Mastociti attivati possono potenziare l'omeostasi tissutale del microambiente tumorale "deregolamentato" favorendo la crescita tumorale e la diffusione attraverso il rilascio di fattori pro-angiogenici, come VEGF o triptasi, che promuovono la formazione e la migrazione delle cellule endoteliali, il rilascio di proteasi, ad esempio metalloproteasi di matrice (MMP), e altri fattori di crescita con lo scopo di permettere la proliferazione dei fibroblasti e migliorare la risposta angiogenica e allo stesso tempo, degradare l'ECM facilitando così l'invasione delle cellule tumorali dello stroma (Biswas et al., 2014).

Infine mediante il rilascio di citochine, come TGF- β 1, i TAMCS contribuiscono alla soppressione immunitaria dell'ambiente tumorale, ad esempio mediante ripolarizzazione dei macrofagi ad un fenotipo M2, e al rimodellamento tissutale mediante reclutamento di altre cellule immunitarie, come le cellule T attivando il sistema adattativo, o le cellule B attivando così la risposta umorale (Ammendola et al., 2016).

Non è comunque escluso, che gli stessi mediatori, rilasciati dai mastociti possano avere anche effetti anti-tumorali. Ad esempio, sembrerebbe che il TNF possa avere effetti citotossici sulle cellule tumorali, l'eparina inibirne la crescita e l'istamina proteggere contro la tumorigenesi (Oldford and Marshalla, 2014).

I mastociti possono comportarsi, quindi, come promotori pericolosi, o in alternativa, spettatori innocenti, o tutori essenziali di tumori, a seconda della fase e l'origine delle cellule trasformate, delle caratteristiche del microambiente e della loro localizzazione all'interno tumore (Pittoni and Colombo, 2012).

La comprensione di queste differenze e la loro correlazione con la prognosi del tumore può fornire importanti informazioni per capire il ruolo di TAMCs e di conseguenza la loro utilità terapeutica (Varicchi et al., 2016).

Cellule B, Plasmacellule e Tumori

I linfociti infiltranti il tumore (TIL) hanno dimostrato di avere un significato prognostico in una molteplice varietà di neoplasie e la maggior parte degli studi sono stati condotti sul rapporto tra l'infiltrazione delle cellule T e il microambiente tumorale, mentre il ruolo dei linfociti B infiltranti il cancro (TIL-B), così come quello delle plasmacellule, è ancora poco conosciuto e meno indagato (Knief et al., 2016)

Nonostante i pochi dati presenti in letteratura, recentemente i ricercatori stanno tentando di focalizzare il possibile ruolo delle cellule B nel modulare il sistema immunitario in risposta a i tumori solidi, sebbene Brodt e Gordon (1978) e Monach e collaboratori(1993), avevano già suggerito il possibile ruolo delle cellule B nell'immunità tumorale, dimostrando una ridotta crescita neoplastica in topi con deplezione di cellule B (Brodt and Gordon, 1978; Monach et al.,1993)

Similmente alle altre cellule immunitarie, alcuni studi suggeriscono che le cellule B tumorali infiltranti possiedono un ruolo protettivo contro la progressione della malattia, mediando l'immunosoppressione attraverso la modulazione delle risposte del sistema immunitario, innato e/o adattativo (Berntsson et al., 2016; Schwartz et al., 2016).

Linfociti B e le plasmacellule, proprio come i linfociti T (specialmente citotossici), possiedono la capacità di attivare e modulare l'immunità antitumorale (meccanismo di adattamento), con conseguente aumento della morte delle cellule tumorali e aumento della sopravvivenza (Suemori et al., 2015; Knief et al., 2016).

Altri invece, suggeriscono che le cellule B possono promuovere la carcinogenesi e che la loro presenza è associata ad una maggiore aggressività del tumore e prognosi sfavorevole in pazienti con tumori solidi (Schwartz et al., 2016).

Le cellule B agiscono a favore della crescita neoplastica mediante azioni immunosoppressive sulle altre cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale, quali la secrezione di mediatori infiammatori come il TNF α oppure attraverso il rilascio di immunoglobuline da parte delle plasmacellule, e successiva deposizione di immunocomplessi, o ancora tramite la sovraregolazione di geni pro-angiogenici (Ammirante et al., 2010; Schioppa et al., 2011).

Inoltre, di recente, sono state identificate un sottoinsieme di cellule B, le cellule B-regolatrici (B-regs), che sembra possano essere protagoniste nella patogenesi delle malattie autoimmuni e neoplastiche.

Nei disturbi neoplastici le B-regs, generate in risposta ai segnali derivati del microambiente tumorale, esprimono citochine, come IL-10 e TGF- β , che interagiscono con altre cellule come le cellule T regolatrici (Tregs), le cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSC), i macrofagi associati al tumore, i linfociti T CD4⁺ e T CD8⁺ e le cellule natural killer (NK), o direttamente con le cellule neoplastiche, modulando le risposte immunitarie all'interno del microambiente tumorale (Schwartz et al., 2016).

Ad oggi, l'elenco dei tumori solidi umani che presentano infiltrati di cellule B, B-reg e plasmacellule è in rapida espansione; correlazioni tra presenza di tali cellule e prognosi sono state effettuate in diversi tumori, come quelli ovarici, mammari, gastrici, polmonari “non a

piccole cellule”, tumori del pancreas, esofago, testa e del collo, e carcinomi epatocellulari e vescicali (Iwata et al., 2011; Woo et al., 2014; Ou et al., 2015; Zhou et al., 2016).

Inoltre, nelle neoplasie linfoidi dell’uomo, le cellule B maligne sembrano agire proprio come le B-regs sopprimendo la risposta immunitaria anti-tumorale. Quest’ultimo meccanismo ha portato allo sviluppo di farmaci che ne inibiscono gli effetti immunosoppressivi (Ansell et al., 2015).

Queste osservazioni suggeriscono che anche le cellule B presenti nel microambiente possono essere considerate possibili e strategici target terapeutici, infatti agire nei confronti del loro naturale effetto immunosoppressivo potrebbe portare ad un aumento della risposta immunitaria antitumorale con conseguente diminuzione della crescita neoplastica (Schwartz et al., 2016).

Tipologie tumorali canine selezionate per lo studio

Per il nostro studio sono state utilizzate due tipologie epiteliali neoplastiche nella specie canina: (1) i tumori delle ghiandole epatoidi, neoplasie a localizzazione perianale dal comportamento biologico poco aggressivo nonostante la malignità, e (2) i tumori epiteliali della ghiandola mammaria che, al contrario, presentano un comportamento biologico aggressivo e generalmente accompagnato da fenomeni di metastatizzazione.

Tumori delle Ghiandole Epatoidi

Le ghiandole circumanali, o epatoidi del cane, sono situate attorno alla giunzione muco-cutanea dell'orifizio anale, e sono state descritte, per la prima volta, da Siedamgrotzky nel 1875 (Atoji et al., 1998).

Le ghiandole circumanali, alla nascita, si presentano di piccole dimensioni, ma durante il corso della vita dell'animale vanno incontro a un accrescimento regolato dagli ormoni sessuali, e ciò può essere in parte confermato dalla positività del 50 % circa delle cellule epatoidi e di riserva ai recettori per gli androgeni (AR) .

Tuttavia il ruolo delle ghiandole epatoidi è tuttora sconosciuto, infatti, oltre alla sospettata produzione di feromoni, è noto da tempo che le ghiandole epatoidi esprimono i recettori per gli ormoni steroidei, come indirettamente dimostrato dalla parziale o totale regressione neoplastica o assenza di recidive dopo la castrazione.

Tale regressione è probabilmente dovuta al basso grado di malignità di questi tumori e dal controllo ormonale a cui essi sono sensibili anche negli istotipi neoplastici più maligni.

Infatti, è stato dimostrato che l'espressione del recettore per gli androgeni (AR) è rilevabile in tutte le ghiandole normali e anormali (Pisani et al., 2006).

Petterino e collaboratori (2004) hanno dimostrato l'espressione immunoistochimica dell'ormone GH in ghiandole epatoidi neoplastiche ormono-dipendenti, suggerendone il ruolo nella crescita e progressione neoplastica sotto stimolazione ormonale.

Inoltre, recentemente Nara e collaboratori (2012), hanno studiato la localizzazione degli acidi sialici e sostanze antimicrobiche (lisozima, immunoglobuline A, lattoferrina, β -defensine) in queste strutture ghiandolari tramite metodiche di immunoistochimica ed istochimica per la lectina.

Tutte le ghiandole della zona perianale hanno esibito una serie di acidi sialici, lisozima, Lattoferrina e β -defensine e l'immunoglobulina di tipo IgA solo nelle ghiandole apocrine.

I risultati dello studio suggeriscono il significato specifico delle ghiandole circumanali i cui prodotti, indipendentemente dal ruolo endocrino, potrebbero funzionare principalmente come agenti protettivi per preservare l'integrità della regione anale, considerando che acido sialico e sostanze antimicrobiche sono importanti nei meccanismi di difesa (Nara et al., 2013).

La struttura tipica della ghiandola epatoide è caratterizzata dall'organizzazione in piccoli lobuli, separati da sottili trabecole connettivali, costituiti da cellule poliedriche dai bordi citoplasmatici ben distinti, con abbondante citoplasma eosinofilo, granulare, e nucleo centrale, di grandi dimensioni.

Questo aspetto rende le cellule simili agli epatociti, da cui la denominazione di ghiandole epatoidi.

Alcuni autori sostengono che originino direttamente dai follicoli piliferi, altri che si tratti di ghiandole odorifere a secrezione merocrina deputate alla produzione di feromoni o, ancora, che possano svolgere una funzione endocrina, e infine potrebbero avere un possibile ruolo come agenti protettivi per preservare l'integrità della regione anale (Shabadash and Zelikina, 1998).

Altri autori descrivono, invece, le ghiandole circumanali, non come strutture ghiandolari ma come una struttura facente parte dell'epidermide e da questa considerazione hanno proposto la denominazione di "corpi circumanali" piuttosto che quella di "ghiandole".

Secondo questa teoria, i "corpi circumanali" sono localizzati nel tessuto connettivo sottocutaneo della zona cutanea del canale anale e si spingono in profondità fino ad invadere i fasci muscolari striati dello strato sub-cutaneo dello sfintere anale esterno; sono costituiti da aggregati di 20-30 lobuli separati da sottili setti di stroma collagene in cui si riscontrano capillari e ghiandole apocrine (da 40 a 170 μm); i lobuli, inoltre, si dividono morfologicamente in 2 tipi: quelli con cisti e quelli senza cisti.

I lobuli senza cisti sono costituiti da uno strato basale e da uno strato di cellule epatoidi poliedriche, che sembrerebbero corrispondere a quello germinativo dell'epidermide e da cellule basali circondano i lobuli alla periferia e raramente presentano attività mitotica;

Nei lobuli con cisti, invece, il parenchima consiste di 4 strati distribuiti attorno a cavità cistiche, di circa 200 μm , situate alla periferia del lobulo: il primo strato, più esterno, costituito da cellule basali appiattite con capacità mitotica e, come per i lobuli senza cisti, può essere paragonato allo strato germinativo dell'epidermide; il secondo strato consiste di cellule poliedriche che si appiattiscono in direzione delle cisti, simili ai cheratinociti dello strato

spinoso dell'epidermide; il terzo strato è composto da cellule poliedriche chiare, appiattite, contenenti granuli morfologicamente identici a quelli cheratinoalini della mucosa orale e del tartufo; il quarto strato, quello più interno, è composto da cheratina eosinofila senza nuclei visibili, simile allo strato corneo dell'epidermide. Infine, le cisti dei lobuli, potrebbero essere considerati accumuli di granuli di secrezione o, in base ad altre ipotesi, come canali piliferi chiusi, in quanto nel lume delle cavità cistiche sono presenti frammenti concentrici amorfi di cheratina distaccata.

Le cellule epatoidi parenchimali si moltiplicano per tutta la vita, in un turnover di equilibrio tra la morte cellulare e capacità rigenerativa, mediante due processi degenerativi: formazione di cisti e rimozione delle cellule poliedriche. Al centro dei lobuli, le cellule poliedriche iniziano il processo degenerativo nella regione interna, nel loro citoplasma sono presenti vacuoli o grosse inclusioni autofagiche, si spingono verso la periferia dei lobuli, si differenziano seguendo lo stesso modello dei cheratinociti epidermici, formando le cisti intralobulari.

Il secondo aspetto della degenerazione cellulare è il meccanismo attraverso il quale le cellule poliedriche possono fuggire dai lobuli; infatti, spesso, nel primo strato spesso sono state osservate cellule con vacuoli o inclusioni citoplasmatiche, con nuclei, né degenerati né picnotici, aumentati di volume o compressi come conseguenza della presenza di vacuoli o inclusioni nel citoplasma;

L'origine delle cellule vacuolizzate può essere rappresentata da due tipi di cellule sulla base delle caratteristiche ultrastrutturali. Il primo tipo è rappresentato dalle cellule basali del primo strato, considerate cellule fagocitarie delle cellule poliedriche degenerate.

Il secondo tipo è rappresentato dalle cellule poliedriche che potrebbero trasformarsi in cellule con vacuoli o inclusioni citoplasmatici. Indipendentemente dall'origine, le cellule vacuolizzate perdono progressivamente le connessioni intercellulari e sembra che si allontanino dai lobuli per dirigersi verso le ghiandole apocrine, attraversando il tessuto connettivo, per invadere le pareti dei tubuli apocrini attraverso uno strato di cellule mioepiteliali e si localizzano infine nel lume di tali tubuli per essere escrete attraverso i follicoli piliferi sulla superficie corporea.

In questo processo i tubuli delle ghiandole apocrine giocherebbero un ruolo importante come dotti escretori per le cellule con vacuoli o inclusioni.

Un'alterazione, quindi, del turnover tra morte cellulare e capacità rigenerativa, spesso comporta la comparsa di tumori (Atoji et al., 1998).

I tumori delle ghiandole epatoidi, o circumanali, sono tra i più comuni tipi di neoplasie cutanee del cane e interessano prevalentemente soggetti maschi interi (Hayes et al., 1977) ; si tratta di neoplasie dal comportamento biologico poco aggressivo nonostante la malignità istologica e l'aggressività locale, e nei riguardi dell'eventuale patogenesi, come già descritto, gli ormoni sessuali esercitano un'azione sull'accrescimento delle ghiandole epatoidi e possono influenzare lo sviluppo di tali neoplasie, infatti un'elevata incidenza di tumori testicolari interstiziali associati suggerisce che la produzione di testosterone è concausa nella patogenesi (Dow et al., 1988).

I tumori perianali, in base alla classificazione dei tumori animali dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 2003) sono distinti in: (1) Adenoma delle ghiandole epatoidi, (2) Epitelioma delle ghiandole epatoidi e (3) Carcinoma delle ghiandole epatoidi.

Tumori delle Ghiandola Mammaria

Nella specie canina, come nella donna, i tumori mammari spontanei rappresentano la neoplasia più comune, quasi il 50% di tutti i tumori maligni, e presentano un comportamento biologico spesso aggressivo con elevato tasso di metastatizzazione (Sleeck et al., 2011).

La diagnosi di tumori mammari canini è frequente in quei casi in cui non viene eseguita l'ovarioisterectomia in età prepuberale o puberale nella cagna, a conferma della loro nota dipendenza ormonale. Pertanto, i tumori mammari canini (CMT) sono stati al centro d'intense ricerche negli ultimi decenni. La ghiandola mammaria si trova esclusivamente nei mammiferi e nei cani sono presenti solitamente 10 mammelle, ciascuna caratterizzata da un corpo mammario (costituito da 8-14 lobuli, tessuto connettivo, e cute) e una papilla mammaria (Capezzolo); l'epitelio di tutto il sistema duttale-lobulare è composto da una doppia popolazione, cellule epiteliali luminali e cellule mioepiteliali basali giustapposte da membrana basale, circondata da cellule mioepiteliali fusiformi (Sorenmo et al., 2011).

Recenti evidenze, in medicina umana, suggeriscono che le cellule epiteliali luminali e mioepiteliali basali potrebbero derivare da cellule progenitrici soprabasali localizzate tra i due strati.

Infatti sia le cellule epiteliali luminali che quelle basali esprimono marker immunoistochimici epiteliali per le citocheratine, seppure di tipo differente, citocheratine AE1/AE3 per le luminali, e citocheratine tipo I (K14 e K17) e di tipo II (K5 e K6) per le mioepiteliali basali (Birnbbaum et al., 2004); al contrario, le cellule mioepiteliali fusiformi esprimono altri marker quali la vimentina o l'actina del muscolo liscio (SMA) in quanto dotate di capacità contrattile (Gama et al., 2003).

Durante la tumorigenesi mammaria, la differenziazione specifica delle cellule luminali, basali/miopiteliali e mioepiteliali fusiformi talvolta è mantenuta e la loro valutazione morfologica insieme alle differenze immunofenotipiche possono essere utilizzate nella diagnosi definitiva (Sorenmo et al., 2011); ciò nonostante, la frequente partecipazione di cellule mioepiteliali nei CMT e la morfologia variabile che possono adottare (soprabasali proliferanti, fusiformi o interstiziali stellate) spesso aumenta la difficoltà di una accurata diagnosi morfologica.

Infatti, mentre le cellule mioepiteliali soprabasali mantengono il loro immunoprofilo, le cellule mioepiteliali interstiziali perdono la tipica espressione da parte di marcatori epiteliali (cheratina) e acquisiscono un fenotipo di tipo fibroblastico con una maggiore espressione di vimentina; inoltre, è stato recentemente dimostrato che possono anche andare incontro a trasformazione metaplastica mesenchimale, mediante meccanismi che non sono ancora completamente conosciuti; tali meccanismi potrebbero, però, concorrere a spiegare sia l'origine della metaplasia ossea e cartilaginea, caratteristica dei tumori misti, che un'eventuale ipotesi di transizione epitelio/mesenchimale (EMT) che può coinvolgere le cellule mioepiteliali, ovvero una transizione mioepitelio-mesenchimale (MMT) (Beha et al., 2012).

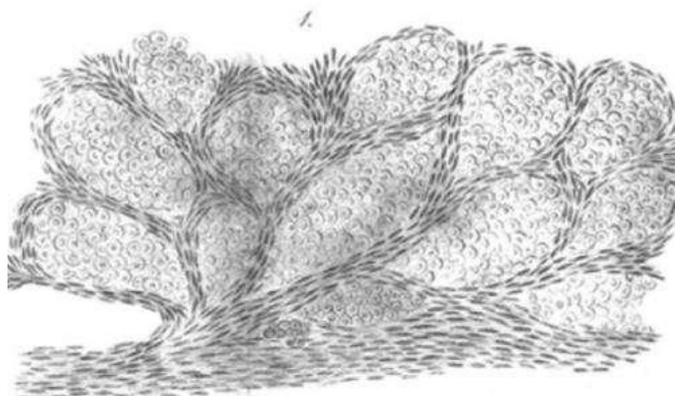
Pertanto, i CMT presentano una morfologia variegata e complessa che può rendere difficoltosa l'identificazione da parte dei patologi, soprattutto nelle indagini di routine con colorazione standard ematossilina-eosina, sebbene giungere ad una diagnosi definitiva è necessario e importante a causa delle diverse prognosi associate ai diversi sottotipi istologici (Sorenmo et al., 2011).

Per ovviare a tali difficoltà Goldschmidt e collaboratori (2011) hanno proposto una classificazione alternativa a quella del WHO del 1974, dove i CMT sono distinti nelle seguenti categorie: neoplasie epiteliali maligne, neoplasie epiteliali maligne di tipo speciale, neoplasie mesenchimali maligne (sarcomi), tumore misto maligno (carcinosarcoma), neoplasie benigne e iperplasie.

Tra le categorie descritte, le neoplasie epiteliali maligne rappresentano le più comuni, in base alle loro caratteristiche morfologiche vengono ulteriormente suddivise in: carcinomi semplici, dove la proliferazione maligna si caratterizza di un solo tipo cellulare, luminale epiteliale/mioepiteliali basali o mioepiteliale; carcinomi complessi caratterizzati da una duplice proliferazione di cellule, epiteliali luminali/mioepiteliali basali e cellule mioepiteliali; e, infine, carcinomi di tipo misto, caratterizzate dalla presenza di tre popolazioni cellulari, ovvero cellule epiteliali luminale/mioepiteliali basali e/o cellule mioepiteliali associate ad una componente di tessuto metaplastico osseo / cartilagineo (Goldschmidt et al., 2011; Penã et al., 2014)

Contributo Sperimentale

Archiv. f. path. Anat. Bd. XXI



Virchows Archiv, European Journal of Pathology 1861. Riproduzione in camera lucida rappresentante cellule tumorali all'interno degli alveoli polomari.

Scopo della Tesi

Le cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale possono supportare l'inizio del cancro, la progressione e le metastasi secondo meccanismi non ancora del tutto conosciuti.

Scopo della presente tesi è stato quello di effettuare una valutazione preliminare della presenza e della possibile interazione tra cellule immunitarie, quali mastociti, macrofagi e plasmacellule, ricomprese nel microambiente tumorale di tumori canini dal comportamento biologico poco aggressivo nonostante la malignità, come i tumori delle ghiandole epatoidi, e in tumori dal comportamento biologico aggressivo e spesso accompagnato da metastasi, come le neoplasie della ghiandola mammaria.

Materiali e Metodi

Per la valutazione preliminare dell'espressione delle cellule immunitarie presenti nello stroma peritumorale e intratumorale del tumore è stato utilizzato sia materiale d'archivio sia campioni biotici, provenienti da animali portati a visita con sospetto di neoplasia, o tessuti provenienti da exeresi chirurgica.

Nello specifico sono state utilizzate due tipologie neoplastiche frequenti nella specie canina: tumori delle ghiandole epatoidei, neoplasie a localizzazione perianale dal comportamento biologico poco aggressivo nonostante la malignità, e tumori epiteliali della ghiandola mammaria che, al contrario, presentano un comportamento biologico aggressivo generalmente accompagnato da fenomeni di metastatizzazione.

Sono stati selezionati 25 casi (Tab. 1) di tumori delle ghiandole epatoidei e 43 casi (Tab. 2) tra iperplasia/displasia e tumori epiteliali della ghiandola mammaria.

Tutti i campioni sono stati trattati come di routine e colorati con Ematossilina-Eosina (EE) per l'esame istopatologico.

Ciascun caso è stato osservato da due patologi in maniera indipendente e i tumori delle ghiandole epatoidei sono stati classificati in accordo la classificazione dei tumori animali dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 2003). Mentre i tumori mammari sono stati classificati in accordo con la classificazione dell'OMS dei tumori animali modificata da Goldshmit e collaboratori (2011).

Per i tumori della ghiandola mammaria è stata, inoltre, effettuata la valutazione dei criteri istologici di malignità secondo Misdorp e collaboratori (2002) e a ciascuno di essi è stato assegnato un grado istologico da 1 a 3 (Tabella 3).

SOGGETTI ESAMINATI

CASO N.	RAZZA	ETA'(Anni)	SESSO	DIAGNOSI ISTOLOGICA
1	Siberian husky	18	M	Iperplasia Adenoma
2	Pastore tedesco.	11	M	Iperplasia Adenoma
3	Barboncino	10	M	Iperplasia/Adenoma
4	Meticcio	17	M	Iperplasia/Adenoma
5	Shih-tzu	12	M	Iperplasia/Adenoma
6	Bulldog inglese	6.	M	Iperplasia /Adenoma
7	Spinone	10	M	Iperplasia /Adenoma
8	Meticcio	n.p.	M	Iperplasia /Adenoma
9	Yorkshire terrier	9	M	Iperplasia/Adenoma
10	Meticcio	11	M	Iperplasia/Adenoma
11	Welsh terrier	9	M	Carcinoma Ben Differenziato
12	Yorkshire terrier	7	M	Carcinoma Ben Differenziato
13	Setter inglese	11	M	Carcinoma Ben Diff.Erenziato
14	Barboncino	10	M	Carcinoma Ben Differenziato
15	Dalmata	8	M	Carcinoma Ben Differenziato
16	Meticcio	10	M	Carcinoma Ben Differenziato
17	Meticcio	10	M	Carcinoma Ben Differenziato
18	Meticcio	9	M	Carcinoma Ben Differenziato
19	Siberian husky	12	M	Carcinoma Indifferenziato
20	Siberian husky	12	M	Carcinoma Indifferenziato
21	Meticcio	10	M	Carcinoma Indifferenziato
22	Siberian husky	11	M	Carcinoma Indifferenziato
23	Yorkshire terrier	11	M	Carcinoma Indifferenziato
24	Siberian Husky	14	M	Carcinoma Indifferenziato
25	Meticcio	14	M	Carcinoma Indifferenziato

Tabella 1: Pazienti con neoplasie delle ghiandole epatoidi selezionati per lo studio.

SOGGETTI ESAMINATI

CASO N.	RAZZA	ETA'(Anni)	SESSO	DIAGNOSI ISTOLOGICA
1	Cirneco dell'etna	7	F	Carcinoma Tubulare G1
2	Meticcio	N.P.	F	Carcinoma Tubulare G1
3	Meticcio	12	F	Carcinoma Tubulare G1
4	Yorkshire terrier	4	F	Carcinoma tubulopapillare G2
5	Yorkshire terrier	7	F	Carcinoma tubulopapillare G1
6	Meticcio	5	F	Carcinoma Tubulopapillare G1
7	Pastore tedesco	11	F	Carcinoma Tubulopapillare G1
8	Yorkshire terrier	10	F	Carcinoma tubulopapillare G1
9	Cocker	15	F	Carcinoma Tubulopapillare G2
10	Cocker	10	F	Carcinoma Tubulopapillare G2
11	Breton	8	F	Carcinoma Micropapillare G2
12	Yorkshire terrier	7	F	Carcinoma micropapillare G3
13	Shih-Tzu	10	F	Carcinoma micropapillare G2
14	Pastore tedesco	5	F	Carcinoma Micropapillare G2
15	Jack Russel	5	F	Carcinoma micropapillare G2
16	Jack Russel	7	F	Carcinoma Micropapillare G2
17	Pastore tedesco	10	F	Carcinoma Micropapillare G2
18	Dalmata	8	F	Carcinoma Micropapillare G3
19	Golden Retriever	8	F	Carcinoma Solido G2
20	Meticcio	10	F	Carcinoma Solido G2
21	Meticcio	8	F	Carcinoma Solido G3
22	Meticcio	12	F	Carcinoma Solido G2
23	Meticcio	14	F	Carcinoma Solido G2
24	Labrador Retriever	12	F	Carcinoma di tipo misto G2
25	Meticcio	14	F	Carcinoma di tipo misto G2
26	Meticcio	7	F	Carcinoma Di Tipo Misto G2

27	Cocker	4	F	Carcinoma Di Tipo Misto G3
28	Meticcio	14	F	Carcinoma Di Tipo Misto G2
29	Cocker	7	F	Carcinoma Di Tipo Misto G2
30	Meticcio	7	F	Carcinoma Di Tipo Misto G3
31	Pastore tedesco	6	F	Carcinoma Di Tipo Misto G3
32	Setter inglese	5	F	Carcinoma Di Tipo Misto G2
33	Setter inglese	9	F	Carcinoma Di Tipo Misto G2
34	Volpino italiano	13	F	Iperplasia/Displasia
35	Meticcio	9	F	Iperplasia Con Atipia
36	Pastore tedesco	N.P.	F	Iperplasia/Displasia
37	Meticcio	6	F	Iperplasia/Displasia
38	Yorkshire terrier	5	F	Iperplasia/Displasia
39	Barboncino	10	F	Iperplasia/Displasia
40	Meticcio	N.P.	F	Iperplasia Con Atipia
41	Siberian husky	10	F	Iperplasia/Displasia
42	Barboncino	6	F	Iperplasia Con Atipia
43	Siberian husky	8	F	Iperplasia/Displasia

Tabella 2: Pazienti con neoplasie della ghiandola mammaria selezionati per lo studio.

	Formazioni Tubulari	Pleomorfismo Nucleare	Ipercromatismo/Mitosi
1Punto	Marcata	Leggera colorazione e pleomorfismo nucleare	Occasionali nuclei ipercromatici e mitosi
2Punti	Moderata	Moderata colorazione e pleomorfismo nucleare	2-3 nuclei ipercromatici o mitosi (HPF)
3Punti	Tubuli pochi o assenti	Marcata colorazione e pleomorfismo nucleare	>2-3 nuclei ipercromatici o mitosi (HPF)
TOTAL SCORE			
	Ben differenziato G1	Moderatamente differenziato G2	Poco differenziato G3
Punti	(da 3 a 5)	(da 6 a 7)	(da 8 a 9)

Tabella 3: Criteri istologici di malignità dei tumori della ghiandola mammaria di cane secondo Misdorp e collaboratori (2002).

Tumori delle ghiandole epatoidi

I tumori perianali, spesso localmente aggressivi ma non metastatizzanti, sono stati suddivisi nelle tre categorie previste dalla classificazione:

- **Adenoma delle ghiandole epatoidi – (10 casi)**

L'adenoma perianale (**Fig.1a**) è costituito da proliferazione ben circoscritta di cellule epatoidi organizzate a formare trabecole anastomizzate, cordoni o isole delimitate alla periferia della lesione da un monostrato di cellule basaloidi di riserva, piccole e con scarso citoplasma, e immerse in uno stroma connettivale fibrovascolare (capillari sinusoidali, che in alcuni casi possono essere estremamente ectasici) con, a volte, cellule immunitarie circondanti le cellule neoplastiche.

Generalmente è possibile osservare alla periferia della lesione aspetti di compressione, e non d'invasione, dei tessuti circostanti; l'attività mitotica è scarsa e limitata allo strato delle cellule di riserva.

Foci di metaplasia squamosa o di differenziamento sebaceo possono essere frequenti riscontri.

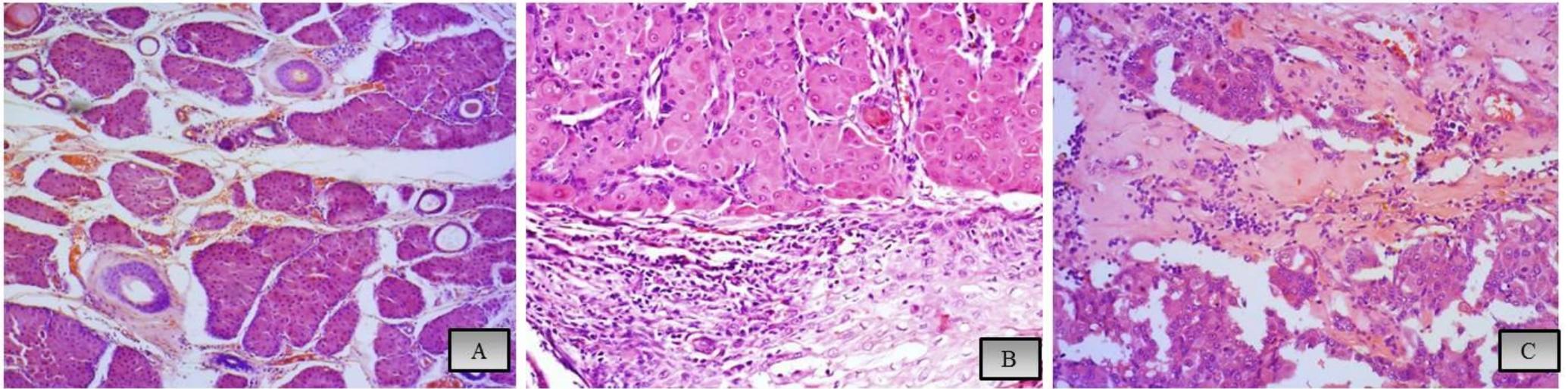
- **Carcinoma delle ghiandole epatoidi – (15 casi).**

La maggior parte dei carcinomi epatoidi non presenta un'architettura lobulare ben definita e tende ad invadere i tessuti connettivi circostanti e i vasi linfatici.

Nel carcinoma epatoide ben differenziato (**Fig.1 b,c**) le cellule mostrano la tipica morfologia epatoide, disposte a formare isole o trabecole di forma irregolare, con nuclei voluminosi e nucleoli multipli prominenti mentre le cellule basaloide di riserva possono essere assenti o presenti su più file alla periferia o anche dislocate al centro dei lobuli.

Nel carcinoma perianale poco differenziato invece solo alcune isolate cellule mostrano l'aspetto epatoide, con nuclei ipercromatici e scarso citoplasma, ed è apprezzabile un'elevata attività mitotica. La caratteristica più importante dei preparati istologici di carcinomi, e che è anche un indice di malignità, è l'invasione, da parte delle cellule tumorali, del connettivo circostante e dei vasi linfatici. La scelta è stata operata privilegiando i campioni che mostravano anche porzioni di cute integra sovrastante, lobuli di ghiandole epatoidi normali e abbondante tessuto peri-neoplastico, in modo da poter meglio valutare i margini di invasione e la popolazione immunitaria stromale lungo i margini della neoplasia.

Nei casi di carcinoma si è avuta cura di selezionare i casi che mostravano diversi gradi di differenziamento cellulare e aree periferiche di iperplasia/adenoma.



*Figura 1:*A) Adenoma, EE (40x); B) Proliferazione ben circoscritta di cellule neoplastiche ben differenziate. EE (20x); C) Proliferazione di cellule epatoidi poco differenziate. EE (40x).

Tumori Mammari

I casi di tumori della ghiandola mammaria sono stati selezionati in modo tale da avere una valutazione dei risultati sugli istotipi con gravità crescente in termini di differenziamento cellulare, invasività e potenziale metastatico.

Di seguito l'elenco degli istotipi scelti dalle lesioni preneoplastiche benigne fino agli istotipi più frequenti di neoplasie epiteliali maligne in ordine crescente di malignità :

- **Iperplasia/displasia – (10 casi)**

L'iperplasia (**Fig. 2a**) è una lesione non neoplastica che consiste nella proliferazione delle cellule di dotti e duttuli lobulari con incremento del numero degli stessi. I dotti sono rivestiti da cellule senza atipie oppure possono mostrare iperplasia epiteliale, ipercromasia nucleare, anisocariosi e anisocitosi e un numero variabile di mitosi. E' difficoltosa la diagnosi differenziale con il carcinoma in situ.

Carcinoma Semplice –(10casi)

Il carcinoma semplice (**Fig.2b**) è composto da un unico tipo cellulare che assomiglia o alla cellula epiteliale luminale o alla cellula mioepiteliale. Nell'ambito del carcinoma semplice distinguiamo:

a) Il sottotipo tubulare caratterizzato da formazioni tubulari, rivestite da 1 o 2 strati di cellule epiteliali con morfologia variabile, circondate da stroma intertubulare infiltrato da linfociti, macrofagi o plasmacellule. Le cellule hanno spesso un citoplasma eosinofilo, con

marginari non sempre distinti, e nuclei normocromici, ipocromici o ipercromici, con un nucleolo singolo e voluminoso oppure con nucleoli piccoli e multipli. Quando le cellule neoplastiche infiltrano il tessuto circostante, evocano un'intensa risposta stromale proliferativa inclusa una estesa proliferazione mioepiteliale. La natura infiltrativa del tumore si accompagna a anisocariosi, e aumento dell'attività mitotica.

b) Il sottotipo tubulo papillare si distingue dal tubulare per la presenza di tubuli arrangiati in strutture sessili o peduncolate con caratteristiche papille intraluminali supportate da sottile stroma fibrovascolare di tessuto connettivo.

c) Il cistico papillare presenta delle papille che si estendono all'interno di tubuli dilatati e cistici che possono contenere un materiale flocculento ed eosinofilo misto a granulociti degenerati e macrofagi schiumosi.

- **Carcinoma solido- (5 casi)**

Nel carcinoma solido (**Fig.2c**) le cellule, arrangiate prevalentemente in cordoni, tappeti o masse senza lume, appaiono pleomorfe, da poligonali ad ovali, con scarso citoplasma e margini non netti; i nuclei sono ovali e spesso ipercromatici con cromatina grossolanamente stipata e singolo nucleolo basofilo.

Presentano da lieve a moderata anisocariosi e anisocitosi, mitosi variabili. Infiltrazione neoplastica nei linfatici può essere trovata alla periferia della neoplasia, con metastasi ai linfonodi.

- **Carcinoma micropapillare – (8 casi)**

Il carcinoma micropapillare (**Fig.2d**) si caratterizza per la presenza di una popolazione neoplastica intraduttale arrangiata in aggregati irregolari e micropapille intraluminari prive di stroma fibrovascolare. Le cellule neoplastiche crescono lungo le pareti duttali e infiltrano lo stroma periduttale; si presentano pleomorfe con scarso citoplasma eosinofilo e nuclei ipercromici, centrali e ovali, cromatina granulosa e un unico voluminoso nucleolo centrale. Le aree infiltranti micropapillari possono essere viste in associazione con aree solide o tubulo papillari. Questa neoplasia frequentemente mostra invasione vascolare ed alto tasso metastatico.

- **Carcinoma di tipo misto – (10 casi)**

Questo istotipo di neoplasia epiteliale maligna (**Fig. 2 e, f**) si caratterizza per la presenza di tre popolazioni cellulari supportate da uno stroma fibrovascolare: una componente epiteliale maligna, composta da cellule disposte in tubuli irregolari; una seconda popolazione di cellule fusate mioepiteliali benigne; infine, una terza componente mesenchimale benigna, che consiste di foci di cartilagine e/o di osso e/o il tessuto adiposo, che non presentano nessuna atipia.

Le cellule maligne della componente epiteliale si caratterizzano per il significativo pleomorfismo, per l'aumento dell'indice mitotico, foci di necrosi, e un modello di crescita infiltrativo.

La scelta è stata operata privilegiando quei campioni di carcinoma che mostravano anche aree di tessuto mammario integro o iperplastico/displastico. Sono stati esclusi i campioni con estese aree di infiammazione e necrosi.

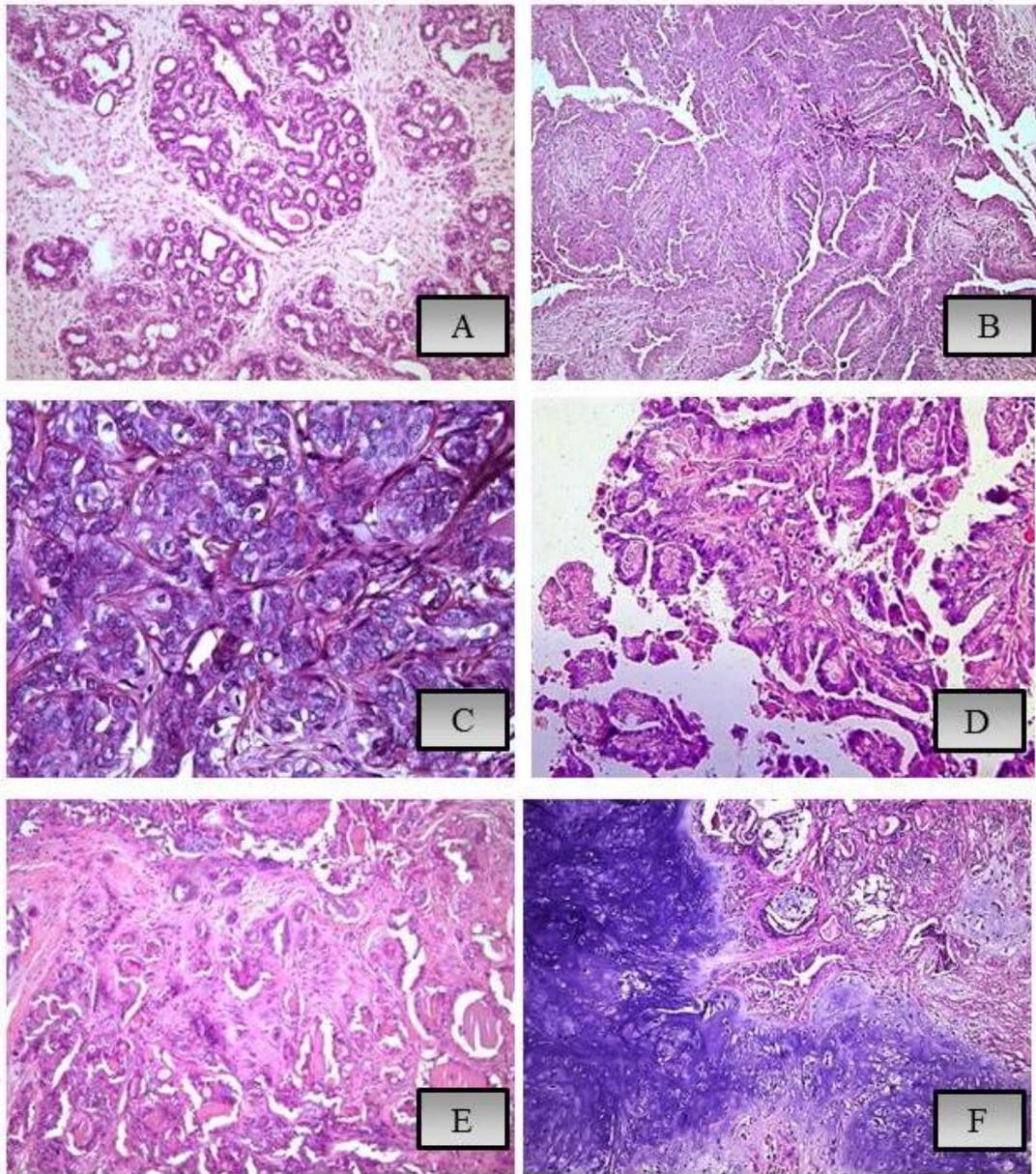


Figura 2: A) Proliferazione non neoplastica di dotti e duttuli, EE 10x; B) Carcinoma tubulo papillare, EE 10x; C) Carcinoma solido, EE 20x; D) Carcinoma micropapillare intraluminale, EE 20x; E,F) Carcinoma di tipo misto, EE 10x.

Colorazione istochimica e immunoistochimica

Ciascun campione è stato sottoposto a colorazioni istochimiche preliminari per l'evidenziazione dell'infiltrato immunitario: blu di toluidina (BT) per l'evidenziazione dei mastociti; reazione all'acido periodico-reattivo di Schiff (PAS) per l'evidenziazione dei macrofagi e verde di metil pironina (VMP) per l'evidenziazione delle plasmacellule.

Successivamente, sulla base dei risultati ottenuti, gli stessi campioni sono stati trattati per l'esame immunoistochimico (metodica ABC e metodica PAP) e di immunofluorescenza come segue.

Sezioni di tessuto dello spessore di 5 micron sono state montate su vetrini polilisinati e incubate a 37°C. La metodica ha previsto un trattamento di smascheramento antigenico con forno a microonde in tampone citrato 0.01 mol/L, pH6, per 15'.

L'attività perossidasi endogena è stata bloccata con acqua ossigenata allo 0,3% in metanolo per 30', mentre le reazioni proteiche aspecifiche sono state inibite previa incubazione con BSA (albumina bovina sierica) al 2,5% per 30'.

I vetrini così preparati sono stati quindi incubati per una notte a 4°C con gli anticorpi primari indicati in Tabella 4.

E' stata quindi eseguita un'incubazione per 30' a temperatura ambiente con anticorpo secondario biotinilato specifico (goat anti-mouse biotinylated IgG , diluizione 1:200, Biospa), sviluppato con avidina acetilata (diluizione 1:250, Biospa), rivelato con 3,3'diaminobenzidina (DAB) (Dako Laboratories) e contro-colorato con ematossilina Carazzi.

Poiché è riportato in letteratura che le cellule immunitarie così come le strutture ghiandolari possono dare una falsa positività con la metodica ABC, le reazioni

immunoistochimiche sono state ripetute su ciascun campione eliminando l'anticorpo secondario coniugato a biotina e sostituendolo con un Ab secondario coniugato a perossidasi, metodica PAP.

Per ciascun campione sono stati eseguiti anche dei controlli negativi: omissione dell'anticorpo primario; sostituzione dell'anticorpo primario con IgG non immunogene dello stesso isotipo e alla stessa diluizione; sostituzione dell'anticorpo primario con un altro anticorpo primario prodotto nella stessa specie, dello stesso isotipo e alla stessa diluizione, ma di alcun interesse per la ricerca in corso.

Il controllo interno è stato effettuato eseguendo per ciascun esperimento anche una reazione con Ab noti e sicuramente positivi, ad esempio panCK e Vim.

Per i marker epiteliali è stato considerato come controllo positivo la cute; per i marker delle cellule immunitarie sono state usate sezioni di linfonodo o mastocitoma o plasmocitoma.

Le sezioni sono state esaminate al microscopio ottico e la colorazione è stata valutata rispetto alla localizzazione (di membrana, citoplasmatica e nucleare) e all'intensità.

Per i marker delle cellule immunitarie è stata successivamente effettuata una conta numerica e la relativa indagine statistica;

Tramite microscopio ottico (DMI6000, Leica) collegato a fotocamera e software per analisi di immagine (Leica Application Suite X), su ciascun vetrino e per ciascuna colorazione specifica sono stati osservati, con obiettivo a 40x di ingrandimento, 10 campi microscopici casuali, sia intratumorali che peritumorali, in cui è stata effettuata una conta numerica di macrofagi, mastociti e plasmacellule.

Anticorpo	Codice/Clone	Secondario	Specificità	Diluizione	Produttore
Macrophage Marker	MAC/387	Mouse Monoclonale	Macrofagi	1:200	Santa Cruz Biotechnology
CD79a	HM47-A9	Mouse Monoclonale	Recettori Linfociti B	1:50	Novocastra
Mast cell Tryptase	10D11	Mouse monoclonale	Mastociti	1:50	Novocastra
β -catenina	17C2	Mouse monoclonale	Attivazione pathway Wnt	1:200	Novocastra
Pancitocheratina	AE1/AE3	Mouse monoclonale	Epitelio	1:200	Santa Cruz Biotechnology

Tabella 4: Anticorpi primari utilizzati

Ciascun campione è stato sottoposto all'esame di immunofluorescenza diretta per la valutazione dell'anticorpo CD79a e delle Immunoglobuline IgA, IgG e IgM, con la seguente metodica.

Sezioni di tessuto dello spessore di 5 micron sono state tagliate e montate su vetrini polilisinati ed incubate a 37°C. I vetrini così preparati sono stati sottoposti ad un trattamento di smascheramento antigenico con tampone citrato (0,1 mol/L, pH6) in forno a microonde per 15'.

L'attività perossidasi endogena è stata bloccata con acqua ossigenata allo 0,3% in metanolo per 30', seguita da trattamento con Sodium Borohydride allo 0,5% per 10', al fine di limitare l'autofluorescenza. Le reazioni proteiche aspecifiche sono state inibite grazie ad una previa incubazione con BSA (albumina bovina sierica) al 2,5% per 30'.

I vetrini sono stati quindi incubati con gli anticorpi primari indicati in Tabella 5 per 1h a 37°C e successivamente per l'anticorpo primario CD79a, si è proceduto anche a incubazione, per 30' a temperatura ambiente, con anticorpo secondario coniugato a fluorocromo (goat anti-mouse IgG-TR, diluizione 1:300, Santa Cruz Biotechnology). Tutti i vetrini sono stati risciacquati in PBS e montati con Prolong Gold Antifade reagent with DAPI (Invitrogen- Molecular Probes).

Per ciascun campione sono stati eseguiti anche dei controlli negativi: omissione dell'anticorpo primario; sostituzione dell'anticorpo primario con IgG non immunogene dello stesso isotipo e alla stessa diluizione; sostituzione dell'anticorpo primario con un altro anticorpo primario, dello stesso isotipo e alla stessa diluizione.

L'osservazione è stata eseguita tramite un microscopio ottico a fluorescenza (DMI6000, Leica) collegato a fotocamera e software per analisi d' immagine.

Anticorpo	Codice/Clone	Specificità	Diluizione	Produttore
Goat Anti Canine IgM:FITC	OBT4039F	IgM cane		Oxford Biotechnology
Sheep Anti Canine IgG:FITC	OBT4041F	IgG cane		Oxford Biotechnology
Goat Anti Canine IgA: FITC	OBT4039F	IgA cane		Oxford Biotechnology

Tabella 5: Anticorpi legati a Fluorocromo

Indagine Statistica

Per l'analisi delle singole componenti immunitarie in ciascuna tipologia neoplastica è stato eseguito il T-test di Student a due variabili indipendenti per la determinazione della prevalenza, intratumorale o peritumorale, di ciascun tipo cellulare all'interno di ogni istotipo neoplastico considerato.

Successivamente per confrontare le componenti immunitarie, sia peritumorali che intratumorali, tra lesioni benigne e maligne e tra i diversi istotipi maligni è stata eseguita l'analisi della varianza (ANOVA One-way a due code), utilizzando il valore delle singole cellule immunitarie come una variabile continua.

Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando GraphPad Prism versione 6.00 per Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com), le differenze sono state considerate statisticamente significative per p -value inferiori a 0.05.

Risultati

Mastociti

Tumori Ghiandole Epatoidi:

La colorazione con BT, specifica per le sostanze metacromatiche come il contenuto granulare dei mastociti, non ha evidenziato differenze, dimostratesi statisticamente significative, tra il numero di mastociti stromali peritumorali e intratumorali (**Grafico 1**), nell'iperplasia/adenoma e nelle lesioni maligne ben differenziate e indifferenziate.

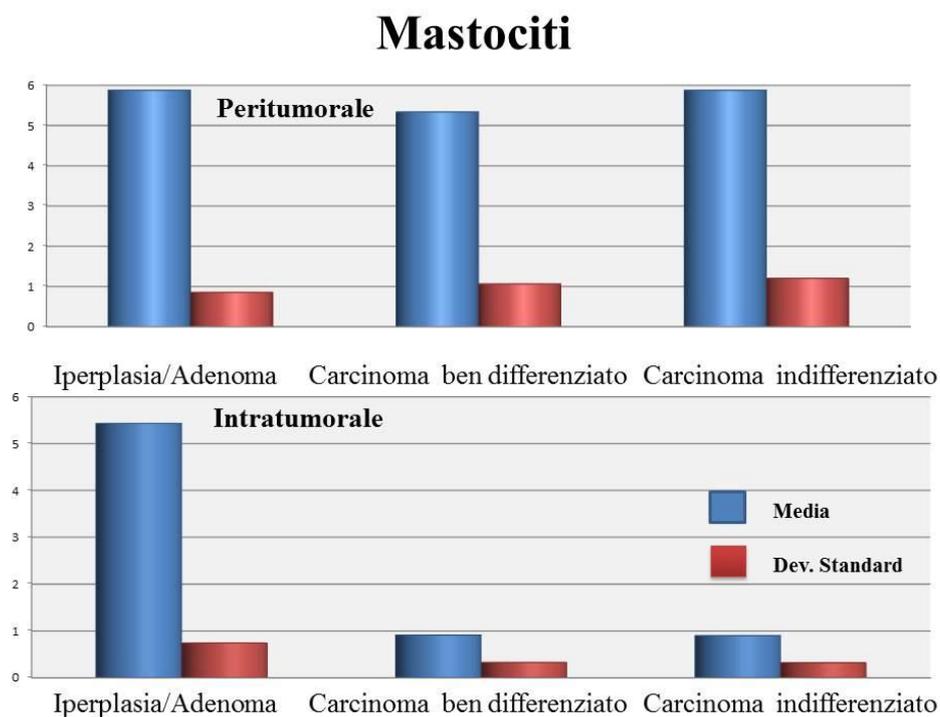


Grafico 1: Presenza di mastociti nelle aree intra e peritumorali di Iperplasia/Adenoma, Carcinoma ben differenziato e Carcinoma indifferenziato nelle ghiandole epatoidi del cane. Sono riportati i valori medi (rosso) e la deviazione standard (blu).

Invece, considerando i mastociti in ciascuna delle tipologie neoplastiche è stato possibile osservare un aumento statisticamente significativo dei mastociti peritumorali rispetto a quelli intratumorali sia nell'iperplasia/adenoma ($p < 0.000014$), sia nel carcinoma ben differenziato ($p = 0.04900$) e indifferenziato ($p < 0.00021$) (**Tabella 6**).

Mastociti	Peritumorale		Intratumorale	
	media	Sd	media	Sd
Iperlasia/adenoma	5,88	0,856089	5,43	0,740945
Carcinoma ben differenziato	5,3375	1,063602	0,9125	0,327054
Carcinoma indifferenziato	5,88	1,202379	0,9	0,321455

Tabella 6: Presenza di mastociti nelle aree intra e peritumorali di Iperplasia/Adenoma, Carcinoma ben differenziato e Carcinoma indifferenziato nelle ghiandole epatoidi del cane. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard.

I dati ottenuti con l'osservazione delle sezioni colorate in BT venivano poi ulteriormente confermati dalle ricerche immunostochimiche con anticorpo anti-Mast Cell Tryptase specifico per i mastociti (**Figura 3**).

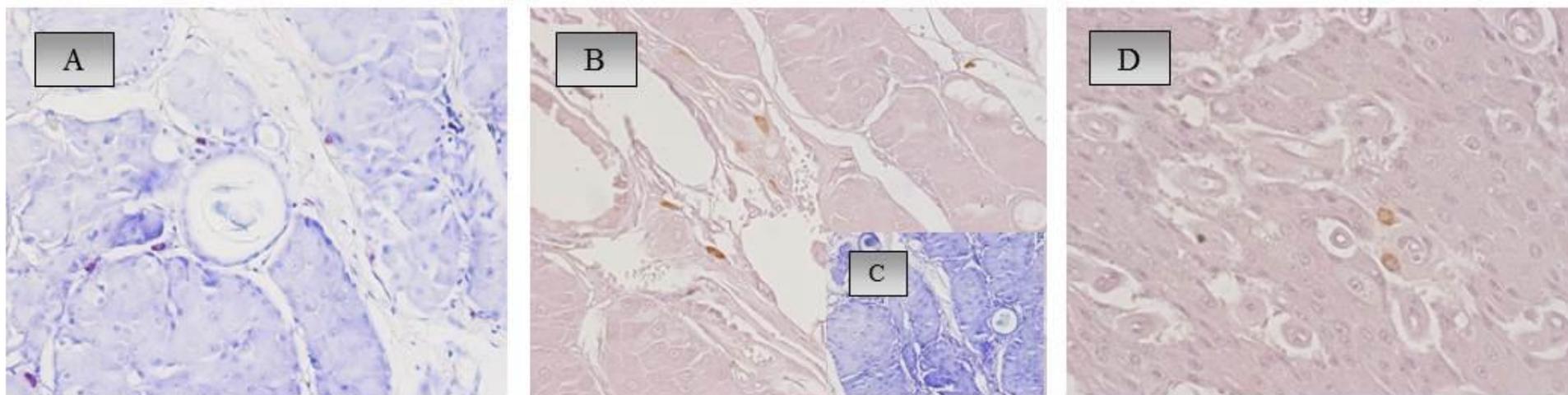


Figura 3: A) Rari mastociti nell'adenoma delle ghiandole epatoidi, BT (10x); B,C) Pochi mastociti peritumorali nel carcinoma ben differenziato., Mast cell tryptase (10x); BT (20x); D) aree intratumorali del carcinoma indifferenziato, Mast cell Tryptase,(40x).

Tumori Mammari:

La colorazione con BT ha evidenziato un notevole aumento del numero di mastociti nelle aree di iperplasia/displasia della ghiandola mammaria, sia all'interno dei lobuli che nello stroma circostante, al contrario delle forme tumorali epiteliali maligne in cui la presenza di queste cellule era nettamente inferiore sia nello stroma peritumorale (f -ratio=8.71324; p =0.000014) che nelle aree intratumorali (f -ratio= 5.198; p =0.001167) (Tabella 7; Grafico 2).

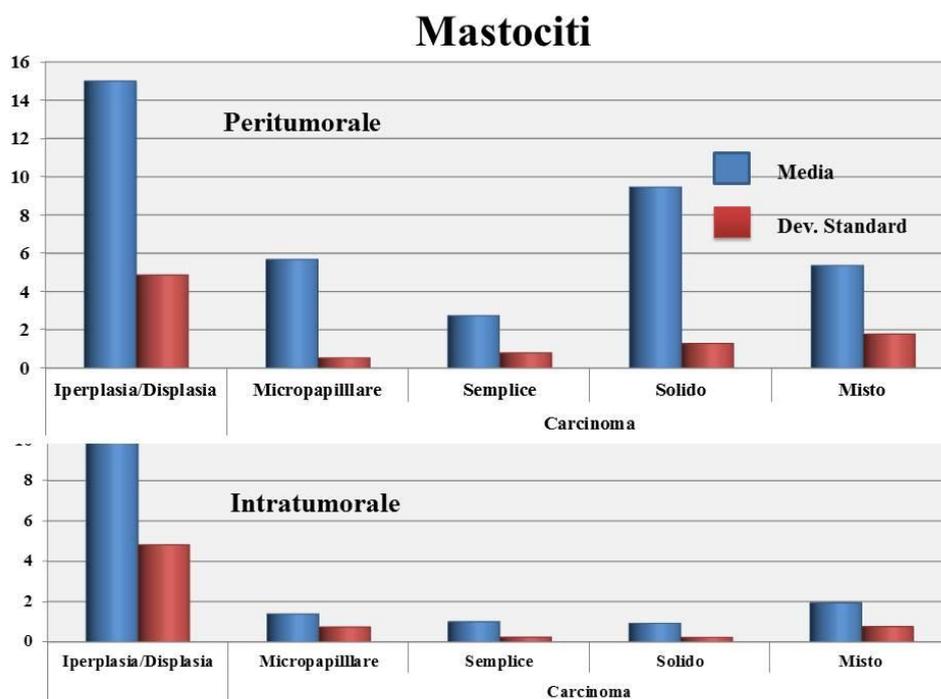


Grafico 2: Presenza di mastociti nelle aree intra e peritumorali di iperplasia/displasia, e carcinomi (Micropapillare, Semplice, Solido e Misto) nelle ghiandole mammarie del cane. Sono riportati i valori medi (blu) e la deviazione standard (rosso).

Nonostante ciò, tra gli istotipi maligni è stato possibile osservare un aumento statisticamente significativo dei peritumorali nel carcinoma micropapillare ($p < 0.0001$), nel carcinoma solido ($p = 0.00019$) e nei tumori misti ($p = 0.0186$) (**Tabella 7**).

I dati ottenuti con l'osservazione delle sezioni colorate in BT sono stati corroborati dalle osservazioni degli stessi preparati con colorazione immunohistochimica con anticorpo anti-Mast Cell Tryptase (**Figura 4**).

		Mastociti				
		Iperplasia/Displasia	Micropapillare	Semplice	Solido	Misto
Intratumorale	Media	11,4375	1,3875	1	0,92	1,94
	Sd	4,814245973	0,737636186	0,235702	0,228035	0,763544
Peritumorale	Media	15	5,675	2,74	9,46	5,36
	Sd	4,866503585	0,531171213	0,787683	1,287633	1,77144

Tabella 7: Presenza di mastociti nelle aree intra e peritumorali di iperplasia/displasia e carcinomi (Micropapillare, Semplice, Solido e Misto) nelle ghiandole mammarie del cane. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard.

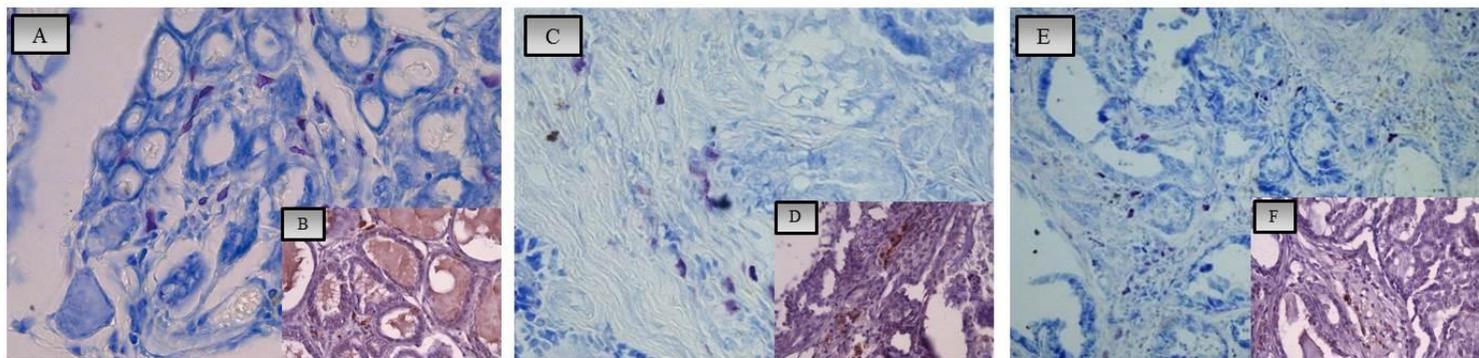


Figura 4: A,B) Elevata presenza di Mastociti nelle aree di iperplasia della ghiandola mammaria, BT(40x), Mast cell Tryptase,(40x); C,D) Stroma peritumorale infiltrante, BT(20x); Mast Cell Tryptase (20x); E,F) Mastociti Peritumorali e intratumorali negli istotipi maligni, BT (20x); Mast Cell Tryptase (20x).

Macrofagi

Tumori Ghiandole Epatoidei

Per la valutazione dei macrofagi infiltranti è stato utilizzato l'anticorpo macrophage marker (Mac/387) in grado di riconoscere la molecola L1 o Calprotectina, antigene intracitoplasmatico composto da una catena alfa a 12kD e una catena beta a 14kD espressa da granulociti, monociti e macrofagi nei tessuti.

La colorazione immunohistochemica mostrava un notevole incremento dei macrofagi nello stroma peritumorale delle aree di iperplasia/adenoma ($p < 0.00001$), ed esponenziale nel fronte d'invasione dello stroma infiltrante dei lobuli neoplastici maligni (f -ratio= 4.228; $p = 0.02141$), così come era netta la prevalenza dei macrofagi peritumorali rispetto alla drastica diminuzione di questi nelle aree interne del tumore, sia nel carcinoma ben differenziato ($p < 0.00017$) che carcinoma indifferenziato ($p < 0.00039$) (**Grafico 3**);

Macrofagi

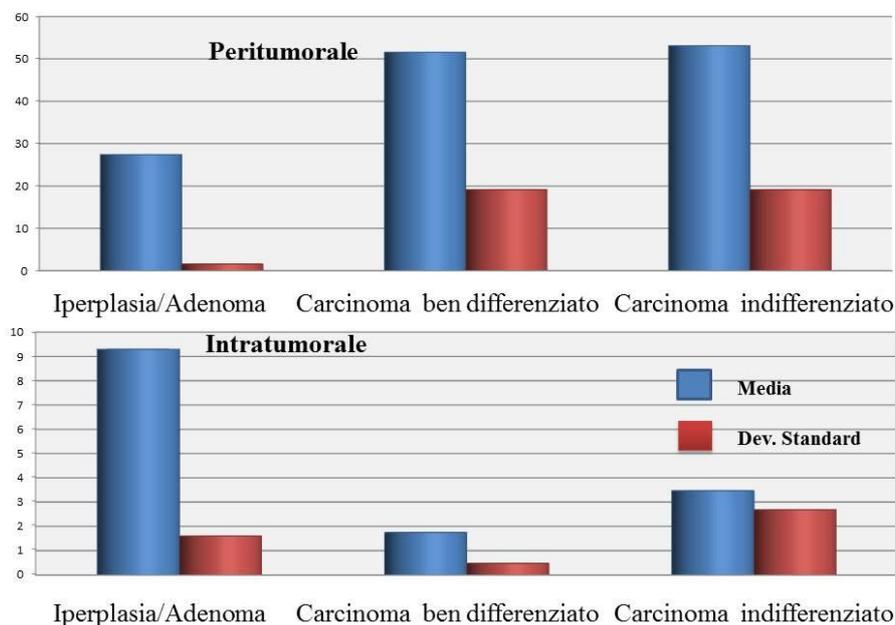


Grafico 3: Presenza di macrofagi nelle aree intra e peritumorali di Iperplasia/Adenoma, Carcinoma ben differenziato e Carcinoma indifferenziato nelle ghiandole epatoidi del cane. Sono riportati i valori medi (rosso) e la deviazione standard (blu).

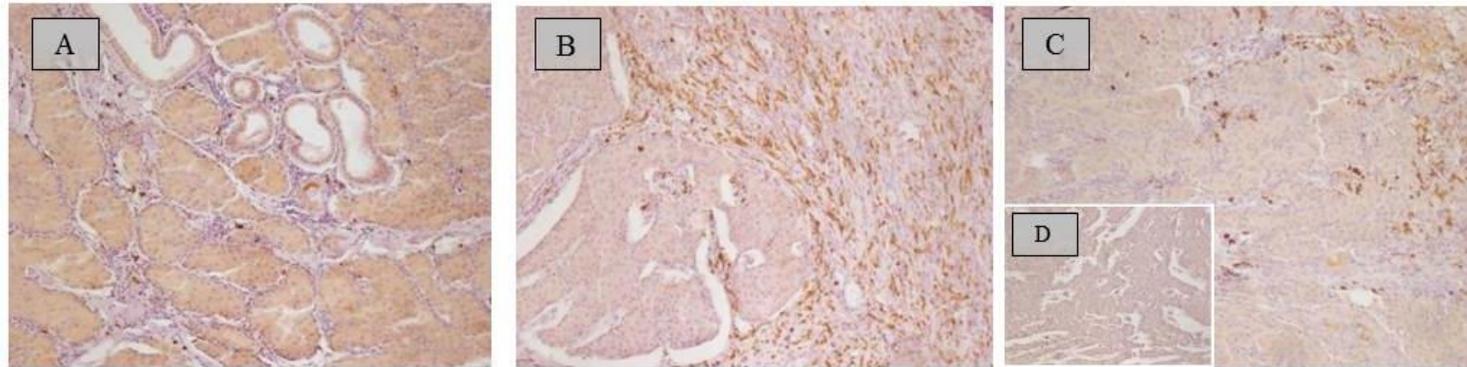
Nella valutazione dei macrofagi intratumorali è stato rilevato un loro incremento nelle lesioni benigne, sebbene numericamente ridotto rispetto allo stroma peritumorale, nei confronti del carcinoma sia bene differenziato che indifferenziato (f -ratio= 8.369; $p=0.00087$)

(Tabella 8) (Figura 5)

Macrofagi	Peritumorale		Intratumorale	
	Media	Sd	Media	Sd
Iperlasia/adenoma	27,42	1,570421	9,29	1,603087
Carcinoma ben differenziato	51,5625	19,14724	1,75	0,48107
Carcinoma indifferenziato	53,1	19,12703	3,471429	2,686829

Tabella 8: Presenza di macrofagi nelle aree intra e peritumorali di Iperplasia/Adenoma, Carcinoma ben differenziato e Carcinoma indifferenziato nelle ghiandole epatoidi del cane. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard.

Durante la valutazione dell'infiltrato macrofagico, nei carcinomi della ghiandola epatoide è stata riscontrata una positività epiteliale all'anticorpo MAC/387 in alcuni cluster cellulari circondati da cellule epatoidi neoplastiche; tali cluster erano inoltre positivi all'anticorpo anti citocheratina AE1/AE3 e in parte all'anticorpo anti β -catenina mentre risultavano negativi con l'anticorpo anti-Vimentina (**Figura 6**).



*Figura 5:*Colorazione Immunoistochimica con l'anticorpo Macrophage Marker/Mac387: a) Aumento della positività nelle aree di Iperplasia/Adenoma.(10x); b) Aumento esponenziale al fronte di invasione delle lesioni maligne.(20x); c) Carcinoma ben differenziato.(10x); d) Rari macrofagi nel carcinoma indifferenziato, (20x).

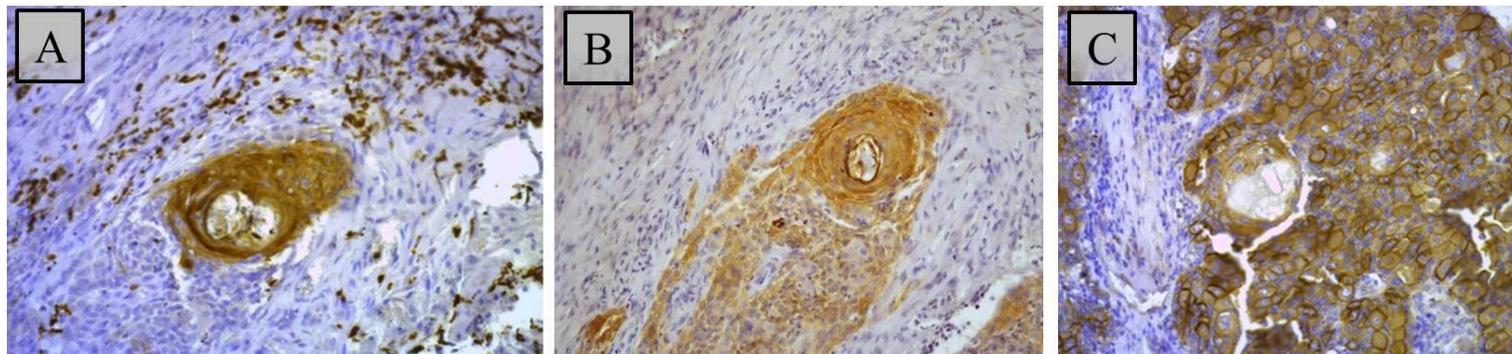


Figura 6: A)Macrofagi attorno a cluster di cellule positive, Macrophage (Marker Mac/387, 20x); B) Cluster epiteliali positivi a pancitocheratina, AE1/AE3, 20x; C) Cluster di cellule circondato da cellule neoplastiche scarsamente differenziate (beta-catenina, 20x).

Tumori Mammari:

La colorazione immunoistochimica con Macrophage Marker mostrava solo piccoli gruppi di macrofagi positivi tra le aree iperplastiche della ghiandola mammaria rispetto ad un moderato aumento numerico che si poteva osservare nel circondante stroma ($p=0.0438$). Un netto incremento caratterizzava la zona infiltrante dello stroma peritumorale delle forme epiteliali maligne ($f\text{-ratio}=10.71015$; $p=0.0001$), nello specifico con maggiore prevalenza nei carcinomi semplici rispetto agli altri istotipi ($f\text{-ratio}=32.946$; $p=0.00001$) così come confermato dalle analisi statistiche condotte sul grading istologico ($f\text{-ratio}=7.746$; $p=0.001804$) (**Grafico 4, Tabella 9**).

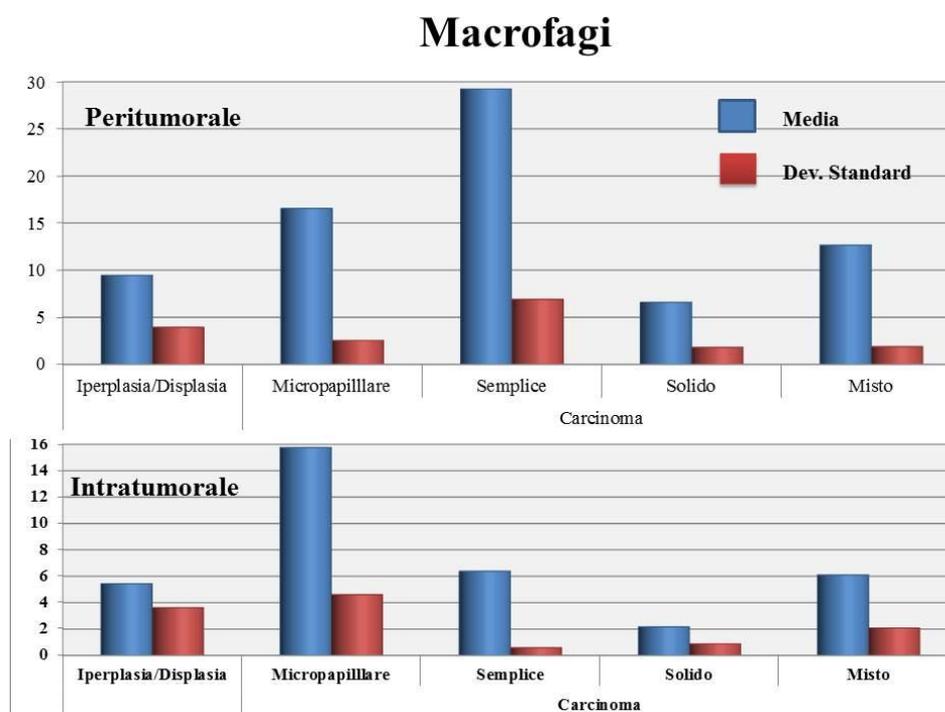


Grafico 4: Presenza di macrofagi nelle aree intra e peritumorali di Iperplasia/Displasia, e carcinomi (Micropapillare, Semplice, Solido e Misto) nelle ghiandole mammarie del cane. Sono riportati i valori medi (blu) e la deviazione standard (rosso).

Nelle aree intratumorali la presenza di macrofagi tra le cellule e intraduttali e intravasali (**Figura 7**), sebbene aumentati rispetto alle zone di iperplasia/displasia, non hanno fornito risultati statisticamente significativi.

		Macrofagi				
		Iperplasia/Displasia	Carcinoma			
			Micropapillare	Semplice	Solido	Misto
Intratumorale	Media	5,44	15,75	6,385	2,16	6,1
	Sd	3,621877966	4,607757434	0,585021	0,879204	2,077258
Peritumorale	Media	9,46	16,55	29,24	6,6	12,66
	Sd	3,936	2,537716	6,899791	1,801388	1,883614

Tabella 9: Presenza di macrofagi nelle aree intra e peritumorali di Iperplasia/Displasia, e carcinomi (Micropapillare, Semplice, Solido e Misto) nelle ghiandole mammarie del cane. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard.

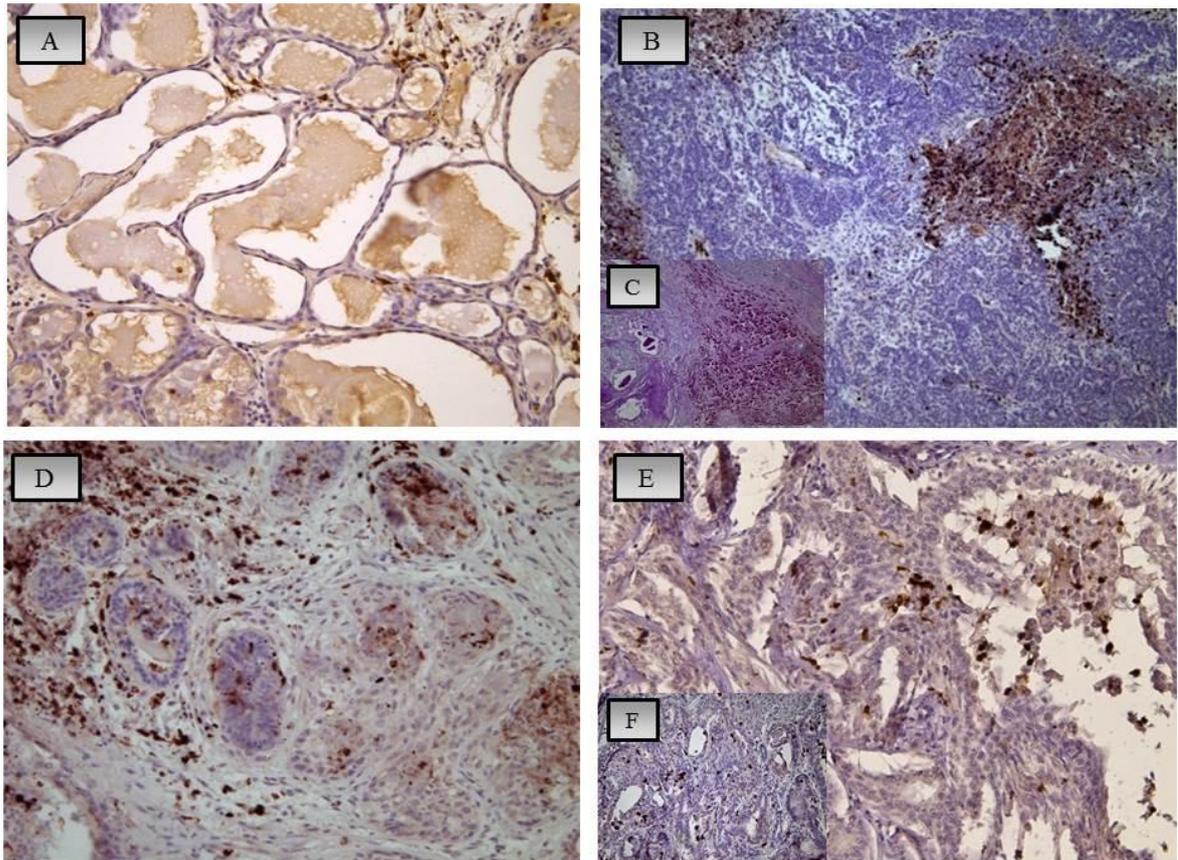


Figura 7: A) piccoli gruppi di macrofagi nelle aree iperplastiche della ghiandola mammaria (IHC, DAB, 20x). B,C) Aumento esponenziale al fronte d'invasione. (B: IHC, DAB, 10x; C: PAS, 10x); D) Macrofagi infiltranti il carcinoma semplice (IHC, DAB, 20x); E,F) Macrofagi intratubulari e intratumorali (IHC, DAB, E:20x, F:10x).

Plasmacellule

Tumori Ghiandole Epatoidi.

La colorazione istochimica con VMP, specifico per le cellule con un'elevata quantità di DNA o RNA quali le plasmacellule, e immunohistochimica con il Marker CD79a evidenziava un notevole aumento peritumorale di cellule nei lobuli in preda a iperplasia/adenoma ($p<0.0001$) e ancora più numerose apparivano nello stroma infiltrante le aree carcinomatose, ben differenziate ($p<0.0001$) e indifferenziate ($p=0.0430$), rispetto alle aree intratumorali, non mostrando però tra loro differenze statisticamente significative (Grafico 5) (Figura 8).

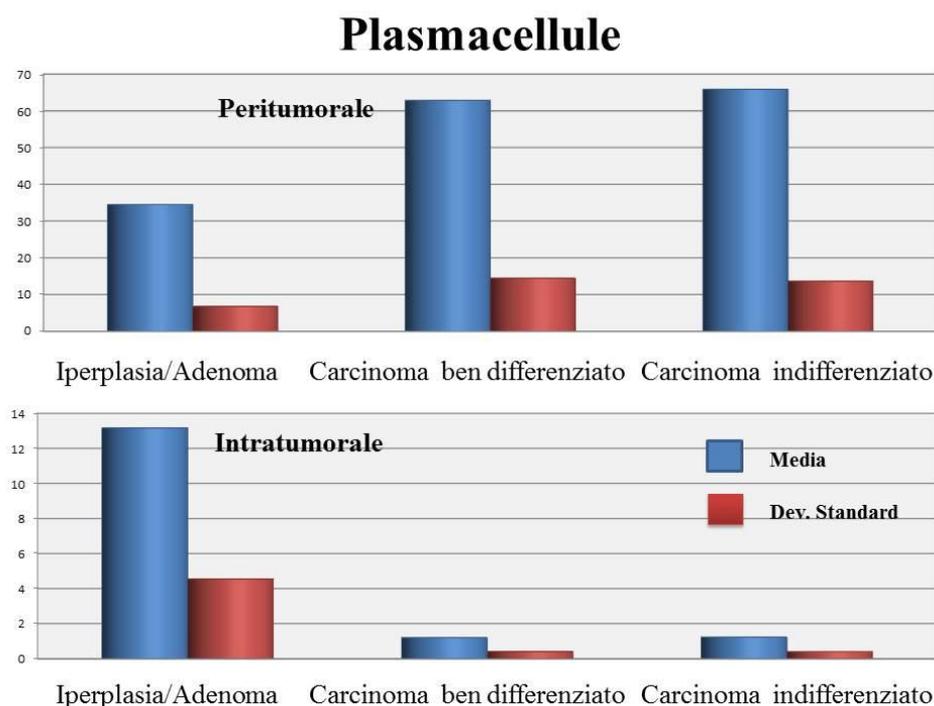


Grafico 5: Presenza di plasmacellule nelle aree intra e peritumorali di Iperplasia/Adenoma, Carcinoma ben differenziato e Carcinoma indifferenziato nelle ghiandole epatoidi del cane. Sono riportati i valori medi (rosso) e la deviazione standard (blu).

Al contrario è stato possibile osservare un aumento statisticamente significativo nell'iperplasia/adenoma delle ghiandole epatoidi rispetto alle aree centrali dei carcinomi, sia ben differenziate che indifferenziate, che invece mostravano solo poche cellule positive (f -ratio=17.357; $p=0.00001$) (**Tabella 10**).

Plasmacellule	Peritumorale		Intratumorale	
	Media	Sd	media	Sd
Iperlasia/adenoma	34,49	6,77388	13,16	4,553192
Carcinoma ben differenziato	62,825	14,44485	1,2	0,417475
Carcinoma indifferenziato	65,84286	13,65123	1,228571	0,40708

Tabella 10: Presenza di plasmacellule nelle aree intra e peritumorali di Iperplasia/Adenoma, Carcinoma ben differenziato e Carcinoma indifferenziato nelle ghiandole epatoidi del cane. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard.

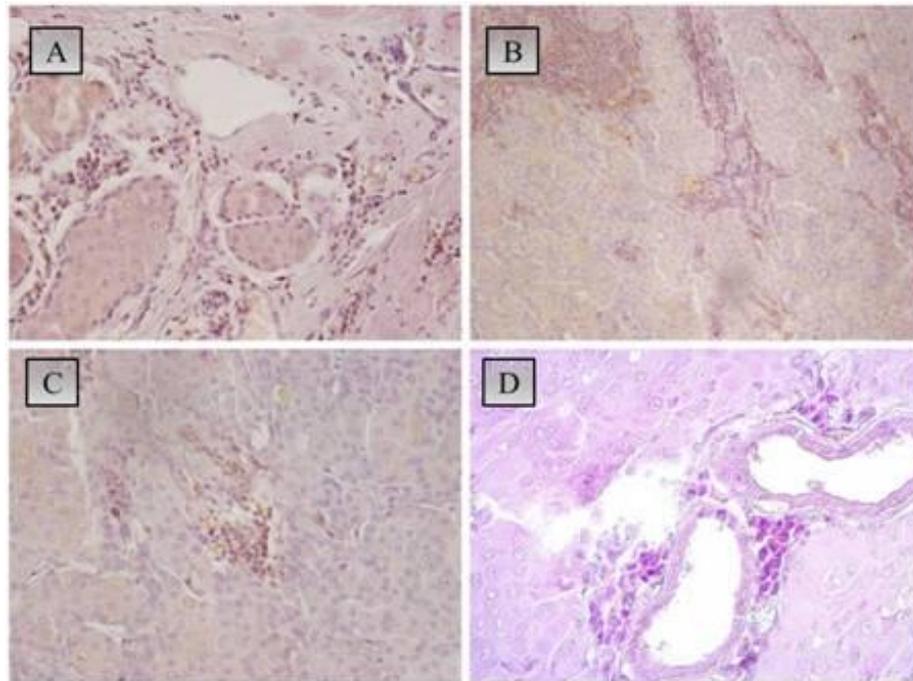


Figura 8: A) Numerose plasmacellule nell'Iperplasia/Adenoma(IHC DAB, 20x) ;B) incremento al fronte d'invasione delle aree carcinomatose (IHC DAB, 10x); C,D) gruppi di cellule positive nello stroma intratumorale delle aree carcinomatose (IHC DAB, 40x);VMP, 40x.

Tumori Mammari

La colorazione istochimica con VMP e l'immunoistochimica con il Marker CD79a nello stroma circostante le aree iperplastiche evidenziava una notevole presenza di plasmacellule sebbene ridotta rispetto alle aree infiltranti peritumorali delle neoplasie epiteliali maligne (f -ratio=2.581; p =0.040093). Nello specifico tra gli istotipi considerati si evidenziava un aumento nello stroma infiltrante dei carcinomi micropapillari (f -ratio=2.58; p =0.040093) (**Grafico 6**).

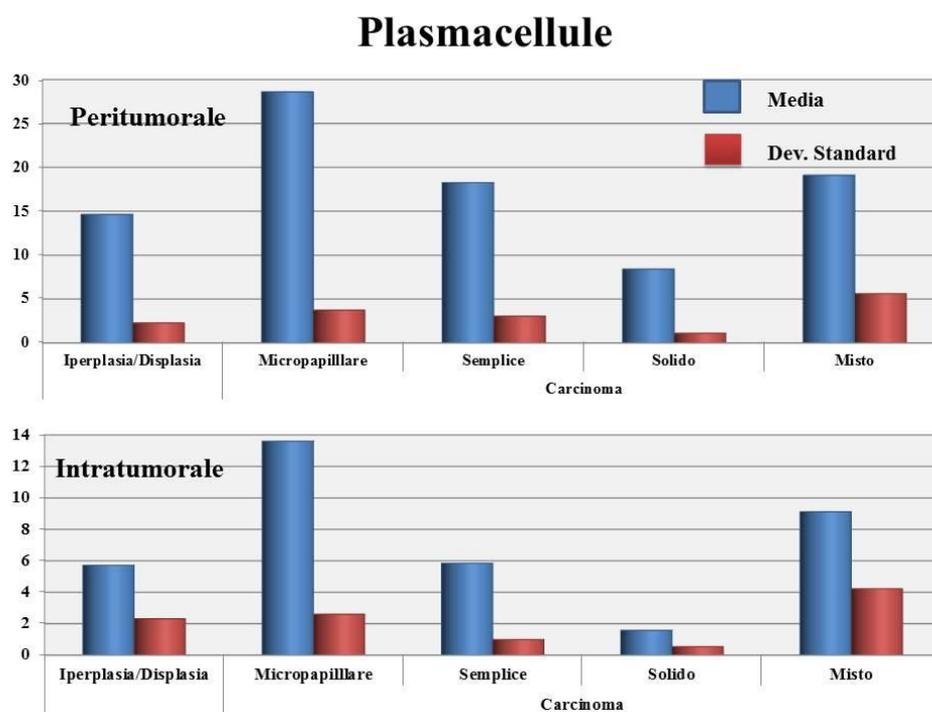


Grafico 6: Presenza di plasmacellule nelle aree intra e peritumorali di Iperplasia/Displasia, e carcinomi (Micropapillare, Semplice, Solido e Misto) nelle ghiandole mammarie del cane. Sono riportati i valori medi (blu) e la deviazione standard (rosso).

Medesimo risultato è stato osservato tra le aree iperplastiche e quelle propriamente carcinomatose (f -ratio=8.69204; p =0.000017). Tra i vari istotipi un netto incremento

intratumorale di plasmacellule è stato rilevato nei carcinomi micropapillari e nei tumori misti rispetto al carcinoma solido e quello semplice (f -ratio=9.99525; p =0.000036) (Tabella 11) (Figura 9). Nella valutazione rispetto al grading istologico non è stata rilevata alcuna significatività statistica.

		Plasmacellule				
		Iperplasia/Displasia	Carcinoma			
			Micropapillare	Semplice	Solido	Misto
Intratumorale	Media	5,716666667	13,6	5,84	1,58	9,12
	Sd	2,312934644	2,600549393	0,980023	0,54037	4,223387
Peritumorale	Media	14,63333333	28,5875	18,26	8,42	19,1
	Sd	2,284440121	0,737636186	3,047476	1,091788	5,615603

Tabella 11: Presenza di plasmacellule nelle aree intra e peritumorali di Iperplasia/Displasia, e carcinomi (Micropapillare, Semplice, Solido e Misto) nelle ghiandole mammarie del cane. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard.

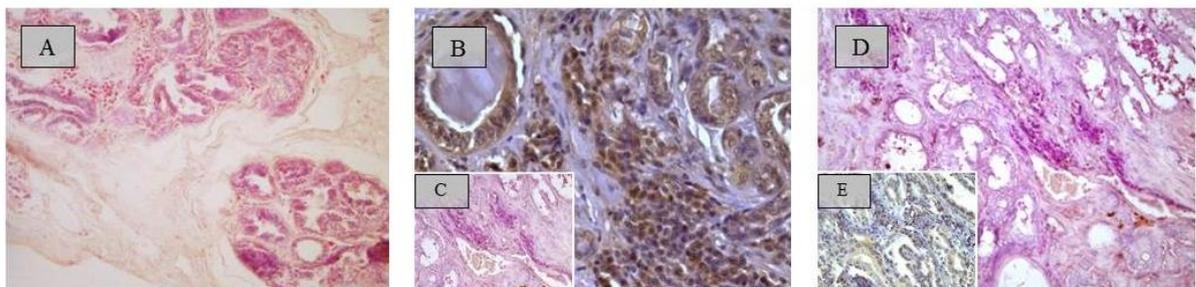


Figura 9: A) Plasmacellule nelle aree iperplastiche della ghiandola mammaria (VMP 10x); B,C) incremento al fronte d'invasione delle aree carcinomatose, (IHC DAB, 40x; VMP, 20x); D,E) Aumento numerico, rispetto alle aree iperplastiche, nel carcinoma micropapillare (VMP 10x; IHC DAB, 20x).

Positività epiteliale al CD79a

Inaspettatamente, numerose cellule neoplastiche presentavano una marcatura immunoistochimica al CD79a, recettore specifico per le plasmacellule.

Ghiandole epatoidi

La positività nelle cellule epatoidi appariva di aspetto granuloso e dispersa nel citoplasma. Nei lobuli con iperplasia/adenoma le cellule positive al CD79 erano disposte alla periferia dei lobuli o raggruppate nelle aree centrali degli stessi.

La positività rimaneva intensa nelle aree carcinomatose adiacenti lo stroma infiltrato da cellule immunitarie mentre nelle aree centrali della neoplasia rade cellule positive erano disperse nella massa neoplastica (**Figura 10**).

Ghiandola mammaria

Nelle aree iperplastiche della ghiandola mammaria l'epitelio mostrava debole positività al CD79a che invece appariva intensa nelle cellule mioepiteliali basali dei lobuli neoplastici nei tumori solidi, diffusa nei vari strati di cellule dei tubuli dei carcinomi tubulo papillari e marcata nelle aree tipiche dei carcinomi micropapillari. Tale positività all'anticorpo Cd79a, sia con metodica immunoistochimica che mediante immunofluorescenza, era sovrapponibile (**Figura 11**).

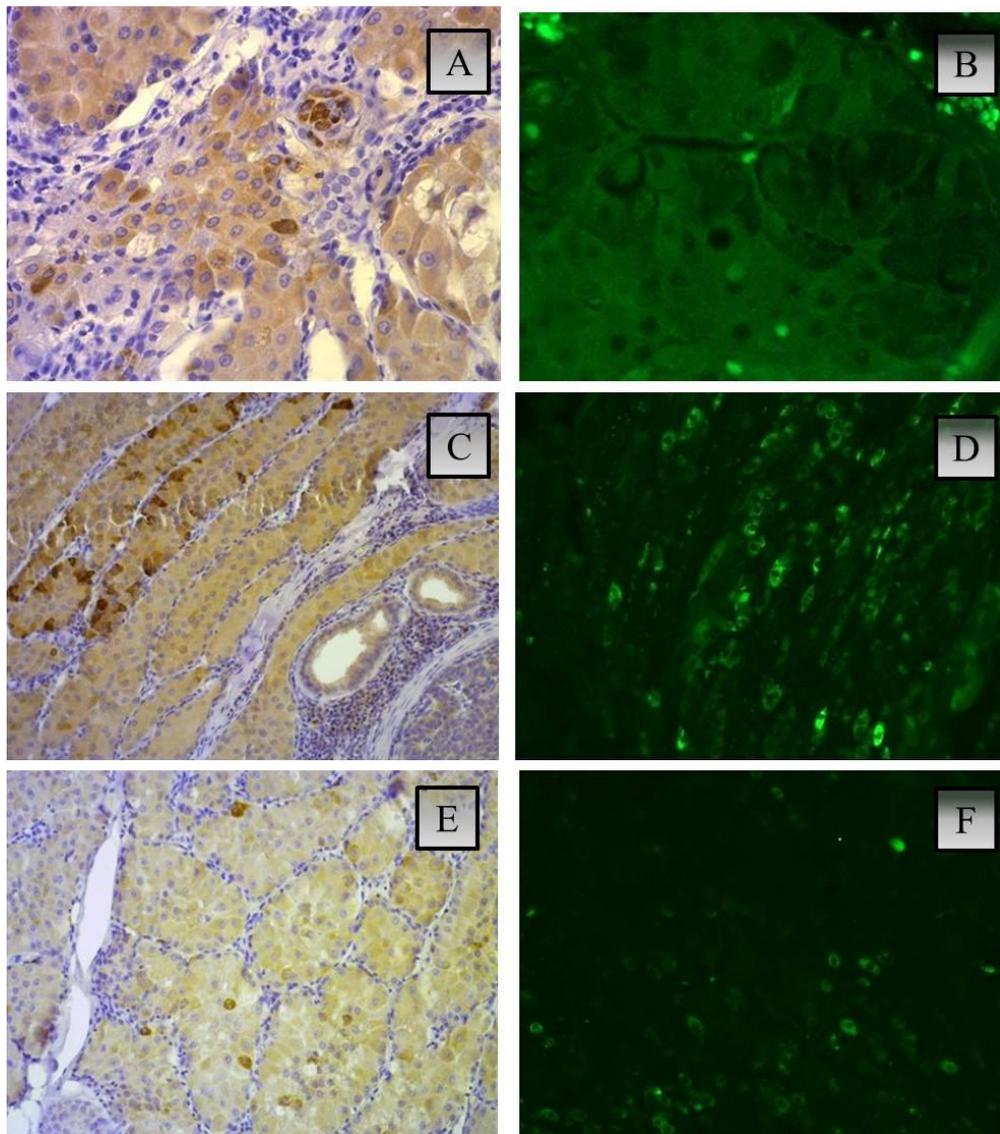


Figura 10: Immunofluorescenza e Immunoistochimica con anticorpo anti-CD79a.:A,B)Complesso Iperplasia/Adenoma.Cellule epatoidi di aspetto granuloso raggruppate nelle aree centrali dei lobuli(40x;C,D) Carcinoma ben differenziato. Cellule positive disperse nella massa neoplastica,(10x); E,F) Rare cellule positive nel Carcinoma indifferenziato,(10x).

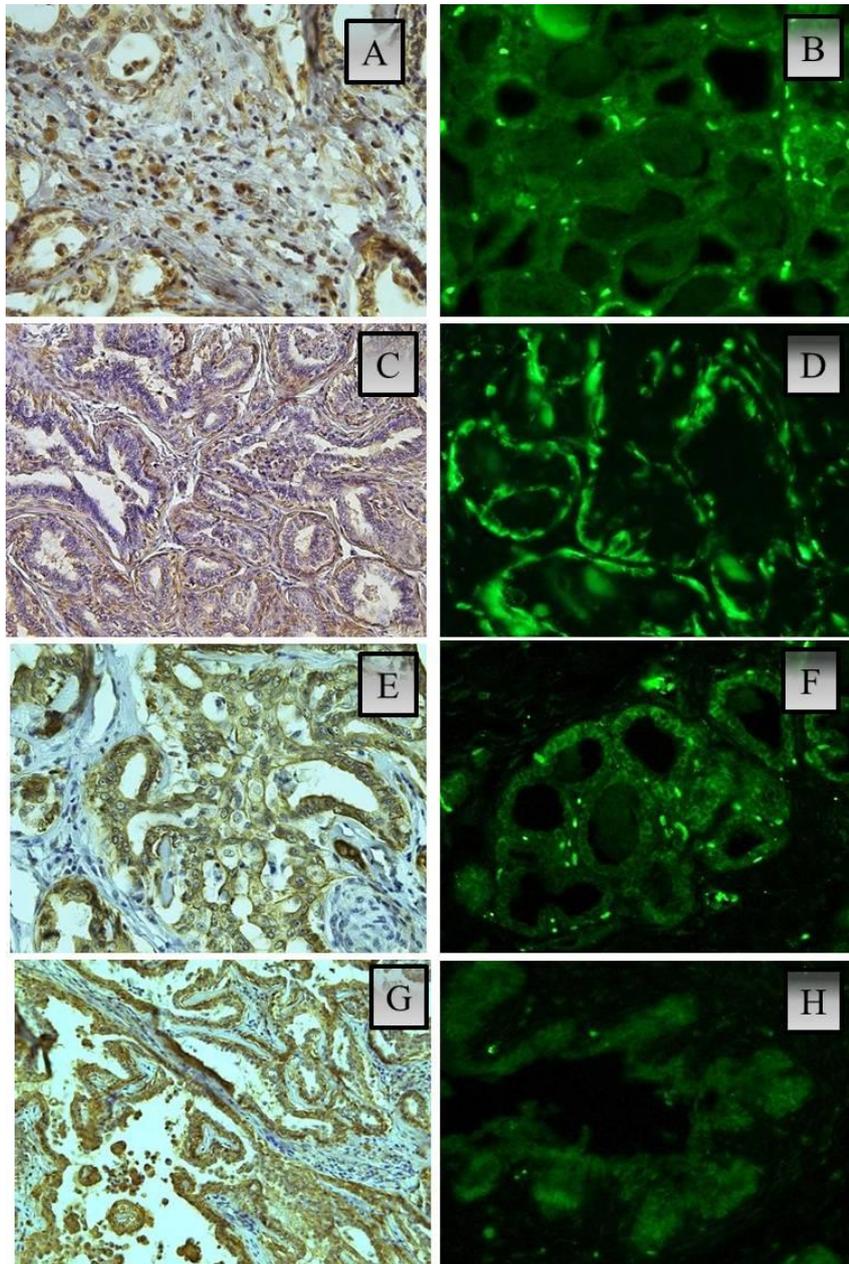


Figura 11: Immunofluorescenza e Immunoistochimica con anticorpo anti-CD79a. A,B) Debole intensità nell'iperplasia (40x); C,D) Cellule basali marcatamente positive (20x;40x); E,F) carcinoma tubulo-papillare (40x); G,H) Positività da moderata a intensa nelle micropapille (20x;40x).

Immunoglobuline

Vista la positività epiteliale al marker CD79a è stata valutata l'eventuale espressività delle Ig nell'epitelio sia dei tumori delle ghiandole epatoidi che di quelli mammari:

Tumori Ghiandole Epatoidi

Le immunoglobuline coniugate a FITC apparivano variamente localizzate nelle plasmacellule stromali.

Inoltre, l'immunofluorescenza con anticorpo anti-IgA appariva intensa in molte cellule epatoidi nell'iperplasia/adenoma e le cellule erano sempre disposte alla periferia o al centro dei lobuli.

Nei carcinomi le cellule positive erano sempre morfologicamente ben differenziate e raggruppate in piccoli ammassi e la positività appariva localizzata ad un polo cellulare o dispersa in tutto il citoplasma.

L'immunofluorescenza con anticorpi anti-IgM era localizzata ed omogenea in numerose cellule sia nelle lesioni benigne e maligne.

L'immunofluorescenza con anticorpi anti-IgG era riscontrabile in entrambe le proliferazioni neoplastiche sebbene con maggiore intensità e distribuzione nelle lesioni maligne rispetto i corrispettivi marcati per le IgM o IgA (**Figura 12**).

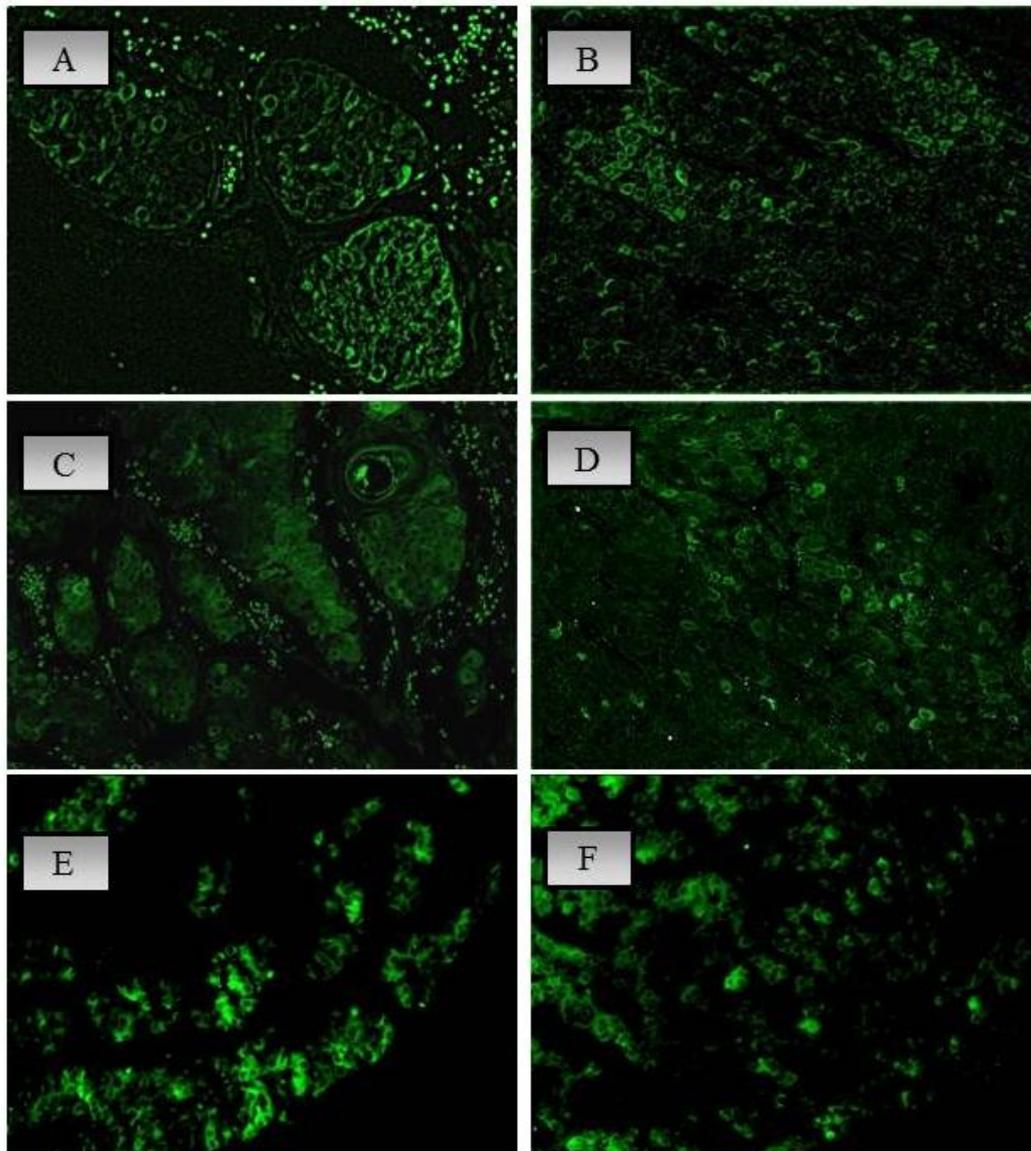


Figura 12: :A,B) Immunofluorescenza per l'evidenziazione delle IgA in iperplasia/adenoma, (20x)(A) e carcinoma,(20x) (B) delle ghiandole epatoidi. C,D) Immunofluorescenza per l'evidenziazione delle IgM in iperplasia/adenoma (20x) (C) e carcinoma(20x) (D) delle ghiandole epatoidi. E,F) Immunofluorescenza per l'evidenziazione delle IgG in iperplasia/adenoma (20x)(E) e carcinoma (20x) (F) delle ghiandole epatoidi.

Tumori Mammari:

L'immunofluorescenza con anticorpi anti-IgG appariva intensa nelle aree di iperplasia, soprattutto nelle aree intraluminari e nelle aree infiltranti lo stroma periduttale nelle diverse forme neoplastiche; negli istotipi con più alto grado di malignità la positività era localizzata in cellule tumorali singole o organizzate in piccoli nidi o cordoni isolati, mentre diminuiva di intensità nelle tipiche papille intraluminari proprie del carcinoma micropapillare (**Figura 13**). Diversamente, l'immunofluorescenza con anticorpo anti-IgA appariva meno intensa nelle aree di iperplasia, ridotta nei carcinomi solidi, mentre si mostrava più o meno marcata nelle papille intraluminari del carcinoma tubulo papillare e intensamente marcata nelle aree micropapillari. L'immunofluorescenza con anticorpi anti-IgM si mostrava lieve o assente nei diversi istotipi neoplastici considerati (**Figura 14**).

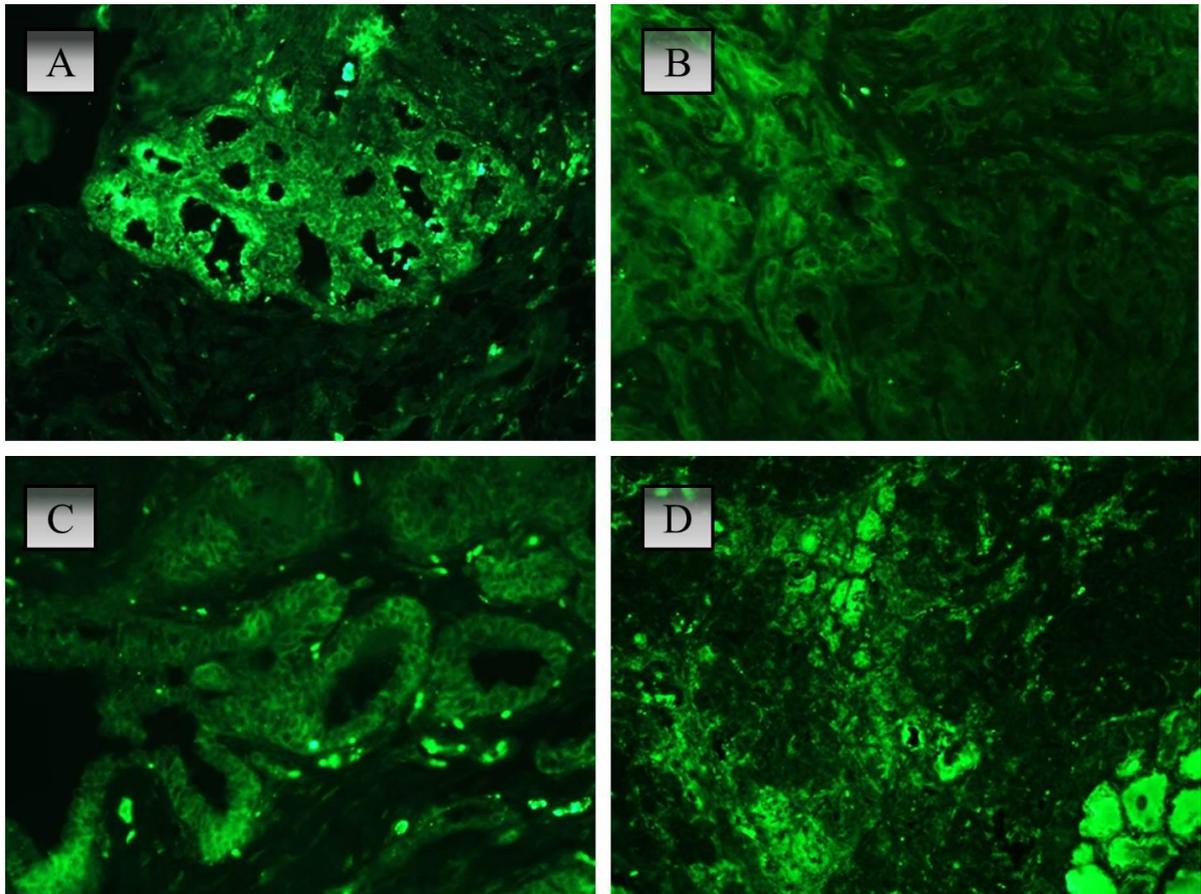


Figura 13: Immunofluorescenza con anticorpi anti-IgG. A) Intensa positività intraluminale nelle aree di iperplasia (20x); B) Marcata intensità nelle aree infiltranti lo stroma periduttale nel carcinoma solido (40x); C) Carcinoma tubulare (40x) e D) Carcinoma micropapillare (20x): positività localizzata in cellule tumorali singole o organizzate in piccoli nidi o cordoni isolati.

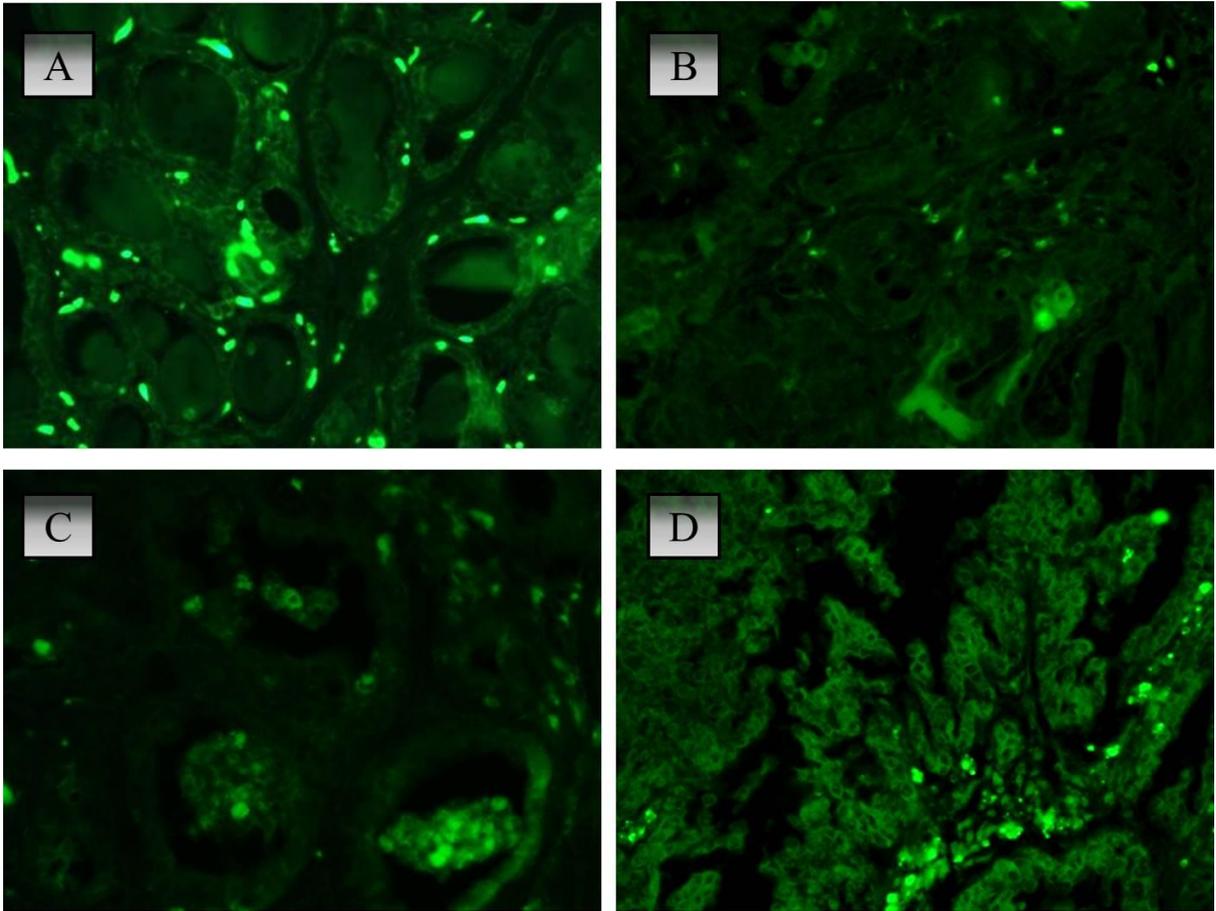


Figura 14: Immunofluorescenza con anticorpo anti-IgA. A) Moderata intensità nelle aree di iperplasia del tessuto mammario(20x); B) Scarsa intensità nelle aree di carcinoma solido(20x); C) Marcata positività nelle tipiche papille intraluminari del carcinoma tubulo-papillare (40x); D) Positività da moderata a intensa nel carcinoma micropapillare(20x).

Discussioni e conclusioni

Il ruolo dei mastociti (TAMC) nel microambiente tumorale è ancora dibattuto perché la loro presenza è associata sia a una buona che a una cattiva prognosi a seconda del tipo di tumore e la localizzazione tissutale.

Questa dicotomia si basa sulla capacità dei MCs, che si accumulano alla periferia dei tumori, di secernere un ampio spettro di mediatori che possono promuovere l'angiogenesi tumorale, l'immunosoppressione e la crescita tumorale (Pittoni and Colombo, 2012; Ribatti, 2013).

La loro presenza potrebbe contribuire a rimodellare il microambiente e influenzare profondamente il comportamento del tumore, sebbene il loro ruolo nella progressione neoplastica rimanga ancora poco chiaro.

La presenza di mastociti nel microambiente tumorale è stata ampiamente dimostrata in diversi tipi di tumori umani maligni, come il carcinoma della mammella, il melanoma, l'adenocarcinoma colon-rettale e il carcinoma prostatico (Wasiuk et al., 2009).

In medicina veterinaria, nonostante le somiglianze morfologiche e funzionali (fisiologiche e patologiche) riportate tra mastociti umani e quelli canini (de Mora et al., 2006) i pochi dati presenti in letteratura non sono riusciti ad attirare l'attenzione sul ruolo critico di queste cellule stromali.

Mukaratirwa e collaboratori hanno dimostrato la presenza di un elevato numero di mastociti alla periferia di melanomi canini e tumori venerei trasmissibili canini (CTVT), sia nelle fasi di progressione sia in quelle di regressione spontanea, associata, in entrambi i casi, ad un aumento della microdensità vascolare (MVD) (Mukaratirwa et al., 2006;). Risultati

analoghi sono stati rilevati anche sui tumori mammari canini, suggerendo che l'attivazione dei mastociti promuove l'angiogenesi, evento cruciale per la progressione tumorale e una prognosi sfavorevole (Lavalle et al., 2010).

Ancora, Im e collaboratori hanno evidenziato che MC triptasi positivi nei tumori mammari canini sono direttamente coinvolti nell'attivazione delle metalloproteasi, promuovendo quindi la degradazione della matrice extracellulare oltre che la proliferazione delle cellule endoteliali vascolari e la differenziazione cellulare (Im et al, 2011). Sfacteria e collaboratori, hanno dimostrato un aumento del numero e distribuzione di MCs Epor e Triptasi-positivi sia nella ghiandola normale/iperplastica che nello stroma peritumorale di tumori mammari canini mentre il loro numero diminuiva nella zone propriamente carcinomatose (Sfacteria et al, 2011).

In aggiunta a questi dati, nel presente lavoro, è stato valutato il numero di mastociti anche in relazione al grading istologico. Pertanto, questi ulteriori risultati confermano l'aumento di mastociti TAMC nelle aree iperplastiche della ghiandola mammaria e nello stroma circostante, e una diminuzione negli istotipi tumorali indipendentemente dal grading istologico, ad eccezione di un lieve aumento nei tumori misti e carcinoma anaplastico, che sebbene non statisticamente significativo, rivela la costante presenza dei mastociti nelle così dette aree di invasione tumorale.

Nelle ghiandole epatoidi, invece, non è stata osservata una variazione numerica rilevabile di mastociti sia nelle aree di iperplasia/adenoma che nello stroma peritumorale e nel carcinoma. Questo dato potrebbe essere correlato con il comportamento biologico benigno di queste neoplasie.

Inoltre, i mastociti, per lo più conosciuti come gli iniziatori di reazioni allergiche IgE-dipendenti, come le altre cellule mieloidi, esprimono anche recettori per la porzione Fc degli anticorpi IgG e sembrerebbe che le IgG, se presenti in elevate quantità, siano in grado di legarsi ai mastociti al posto delle IgE impedendone la degranulazione (Daëron, 2016).

Crescenti evidenze, in modelli murini, indicano che i mastociti svolgono un ruolo critico nelle malattie autoimmuni IgG-dipendenti tessuto specifiche, quali sclerosi multipla, artrite reumatoide, pemfigo bolloso e glomerulonefrite (Malbec and Daëron, 2007).

In quest'ottica, i mastociti possono essere quindi iscritti in una varietà di risposte immunitarie adattative e la loro attivazione e la risposta biologica possono essere regolate, positivamente o negativamente, mediante modulazione di anticorpi (Daëron, 2016).

In questo studio è stato osservato che, l'aumento o diminuzione, della presenza di mastociti era sovrapponibile con l'espressione di IgG nelle cellule epiteliali tumorali.

Nello specifico nei tumori mammari è stato evidenziato un aumento sia di mastociti sia di IgG nelle aree iperplastiche e peritumorali, e una loro diminuzione nelle aree propriamente carcinomatose.

Questa correlazione, potrebbe essere considerata l'ennesimo meccanismo di immunoediting da parte delle cellule tumorali. Infatti, alla dimostrata produzione endogena di IgG da parte delle cellule tumorali (Yang, 2013) potrebbe far seguito un loro legame con i recettori presenti sui mastociti, nelle aree iperplastiche o infiltranti il tumore, impedendone in tal modo la degranulazione.

Anche il ruolo dei macrofagi associati al tumore (TAM) nel cancro è un argomento molto dibattuto. Il ruolo dei TAM nei tumori può variare anche nello stesso tipo di cancro, e l'inibizione o la progressione del tumore può essere dettata dal loro fenotipo e via di attivazione.

In alcuni tumori umani, come il cancro al polmone e alla tiroide, così come nei tumori mammari del cane, l'elevata densità dei TAM è stata associata a scarsa sopravvivenza (Raposo et al., 2012). Tuttavia, sempre nei tumori mammari canini e in alcuni tipi di cancro del collo dell'utero della donna, la densità dei TAM è stata associata ad una prognosi migliore (Krol et al., 2014; Takeya and Komohara, 2016).

In accordo con i dati riscontrati in medicina umana e in medicina veterinaria, è stata riscontrata soltanto una positività localizzata a piccoli gruppi di cellule nelle aree iperplastiche della ghiandola mammaria, un aumento nelle aree peritumorali invasive e un aumento statisticamente significativo nel grado istologico di malignità G1; inoltre è stato osservato un incremento di macrofagi intratumorali, rispetto alle aree iperplastiche, soprattutto negli istotipi più maligni, sebbene non sia stato possibile effettuare, per mancanza di dati, una correlazione con la prognosi e sopravvivenza.

Per quanto riguarda i tumori delle ghiandole epatoidi, l'assenza di dati bibliografici, non permette una diretta correlazione con quanto da noi riscontrato, ovvero un netto incremento dei macrofagi al fronte di invasione delle lesioni neoplastiche istologicamente maligne rispetto alle aree intratumorali sia di adenoma che di carcinoma differenziato e indifferenziato.

Inoltre abbiamo riscontrato un aumento o diminuzione parallele tra macrofagi e plasmacellule nelle lesioni, sia benigne sia maligne, delle tipologie considerate; ciò potrebbe essere spiegato dalla presenza della citochina IL-4 (dato non dimostrato) presente nel microambiente, che oltre a promuovere la progressione del cancro al seno e le metastasi, stimola la ripolarizzazione dei macrofagi da M1 al fenotipo protumorale M2 (Noy e Pollard 2014) e regola la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B e T (Venmar et al., 2014).

Durante la valutazione dell'infiltrato macrofagico, nei carcinomi della ghiandola epatoide è stata riscontrata una positività epiteliale all'anticorpo macrophage marker (MAC/387) in alcuni cluster cellulari circondati da cellule epatoidi neoplastiche; tali cluster erano inoltre positivi all'anticorpo anti citocheratina AE1/AE3 e in parte all'anticorpo anti β -catenina mentre risultavano negativi con l'anticorpo anti-Vimentina.

L'anticorpo MAC/387 è in grado di riconoscere la molecola L1 o Calprotectina (S100A8/A9), antigene intracitoplasmatico espresso da granulociti, monociti e macrofagi nei tessuti.

S100A8 e S100A9 sono due membri della famiglia S-100, proteine leganti il calcio, rilevate nelle cellule mieloidi e conosciute per il loro ruolo nel sistema immunitario innato (Goyette and Geczy, 2011).

Nonostante ciò, è stato dimostrato che una loro espressione anormale e/o una sovraespressione è associata a scarsa differenziazione cellulare, progressione neoplastica e metastasi in diverse tipologie tumorali, quali carcinoma gastrico, polmonare, tiroideo,

mammario, pancreatico, carcinoma esofageo a cellule squamose e cancro del colon-retto (Ito et al., 2009; Arai et al., 2000; Arai et al., 2001; Arai et al., 2009).

Inoltre, Duan et al. (2013) hanno dimostrato che queste proteine possono essere correlate ad un aumento dei livelli di espressione e accumulo intracitoplasmatico e nucleare di β -catenina nei carcinomi del colon-retto (Duan et al., 2013) come da noi osservato nei tumori delle ghiandole epatoidi.

La β -catenina è una glicoproteina responsabile dell'adesione tra cellule e tra cellule e matrice extracellulare, si lega direttamente al dominio citoplasmatico della E-caderina e alla rete di microfilamenti actinici del citoscheletro cellulare.

Inoltre questa glicoproteina rappresenta una componente critica delle vie di trasduzione del segnale mediate dal Wnt coinvolte nella proliferazione e differenziazione cellulare; per tale motivo, si ritiene possa essere coinvolta sia nella trasformazione che nella progressione neoplastica.

Normalmente la β -catenina è localizzata a livello delle membrane cellulari, ma nel corso di sindromi neoplastiche tende ad accumularsi nel citoplasma ed eventualmente nel nucleo delle cellule coinvolte partecipano all'acquisizione di un fenotipo tumorale invasivo e metastatico (Elzagheid et al., 2008; Wanitsuwan et al., 2008).

E' stato riportato che molte proteine della famiglia S100, come S100A6, S100B e S100P regolano negativamente la degradazione della β -catenina (Ning et al., 2012) mentre S100A7 inibisce la tumorigenesi tramite una regolazione negativa della β catenina (Deol et al., 2011).

Tuttavia, rimane ancora poco chiaro come le proteine S100A8 e S100A9 regolano anche le vie Wnt/pathway β -catenina e come esercitano i loro effetti sulla progressione neoplastica e la migrazione (Liang et al., 2013).

In maniera conforme, i nostri risultati evidenziano la presenza di cluster di cellule positive a Mac/387, o calprotectina, soprattutto nei carcinomi indifferenziati delle ghiandole epatoidi localizzate nella regione perianale; inoltre, tali cluster appaiono circondati da cellule neoplastiche, con elevato grado di anaplasia, che mostrano positività all'anticorpo β -catenina citoplasmatica e/o nucleare.

Tali dati ci portano a speculare sulla possibile correlazione della β -catenina ed espressione di calprotectina nell'insorgenza dei tumori delle ghiandole epatoidi del cane e sul loro eventuale valore diagnostico e prognostico.

Ancora, anche se poco attenzionato, il ruolo delle cellule B differenziate come le plasmacellule nello sviluppo del tumore e nell'immunosorveglianza è complesso e comporta effetti sia protumorali, favorendo lo sviluppo e la sopravvivenza delle cellule tumorali, che antitumorali partecipando e contribuendo all'immunosorveglianza del cancro, infatti una loro deplezione sembrerebbe favorire la progressione del tumore e lo sviluppo di metastasi (Shimabukuro-Vornhagen et al, 2014).

In Medicina Umana vi sono ancora pochi dati che dimostrano il crescente interesse dell'infiltrato di plasmacellule nei tumori, mentre in Medicina Veterinaria vi è totale assenza di dati, se non sporadici e di date non recenti, che attestano una valutazione tra queste cellule immunitarie e il cancro.

Infatti, nel 1998, Perez e collaboratori, hanno valutato l'infiltrato di plasmacellule CD79, IgA, IgM e IgG positive nel microambiente del Tumore Venereo Trasmissibile Canino, rilevando un aumento di plasmacellule CD79, IgA e IgM positive nelle aree infiltranti il tumore, soprattutto nella fase regressiva e una diminuzione di quelle positive a IgG, che invece risultavano aumentate nella fase progressiva suggerendo che potrebbero partecipare alla progressione neoplastica (Perez et al., 1998).

I nostri risultati evidenziano un moderato aumento di plasmacellule nelle aree di iperplasia/adenoma nei lobuli delle ghiandole epatoidi e un notevole aumento nelle aree di stroma peritumorale infiltrante il tumore, mentre rare cellule positive erano evidenziabili nelle aree carcinomatose; anche nel fronte d'invasione dei tumori mammari è stato riscontrato un evidente incremento di plasmacellule infiltranti, mentre nelle aree iperplastiche della ghiandola mammaria era invece osservabile una riduzione rispetto alle aree intratumorali degli istotipi maligni e in particolare del carcinoma micropapillare.

Inaspettatamente e sorprendentemente abbiamo rilevato una positività epiteliale alle immunoglobuline IgA, IgG e IgM sia nei tumori delle ghiandole epatoidi, neoplasie dal comportamento benigno nonostante la malignità, che nei tumori mammari canini, caratterizzate da un comportamento biologico aggressivo e spesso accompagnati da metastasi, sebbene con localizzazione e intensità differente.

Si è sempre creduto che le immunoglobuline (Igs), note anche come anticorpi, venissero prodotte esclusivamente dalle cellule linfocitarie di tipo B ma non da altri tipi di cellule. Espressa dalle cellule B, la Ig è una delle molecole chiave per la risposta immunitaria

umorale; essa riconosce gli agenti patogeni, li neutralizza direttamente o attiva altre cellule immunitarie per rimuoverli (Chen et al., 2009).

Tuttavia, negli ultimi 10 anni è stato evidenziato che molte cellule normali o maligne di tipo non B, tra cui le cellule epiteliali della cute e della ghiandola mammaria, i gameti, le cellule endoteliali, i cardiomiociti o ancora i neuroni, possono anche essi esprimere immunoglobuline, tra cui IgM, IgG e IgA (Jiang et al., 2015).

La loro presenza è stata osservata sia in condizioni fisiologiche, parafisiologiche (allattamento) (Zhang et al., 2010) che patologiche, quali malattie infiammatorie, autoimmuni (Jiang et al., 2015) e tumori (Hu et al., 2012).

Il riscontro di Ig in condizioni fisiologiche in cellule non-B pone le basi per la comprensione di nuovi meccanismi di interazione tra i vari sistemi regolatori, come ad esempio tra il sistema immunitario e il sistema nervoso o la cute (Niu N et al., 2011; Jiang et al., 2015).

Infatti, la secrezione di immunoglobuline in cellule non-B normali, come in quelle dell'epidermide o delle ghiandole epatoidei, potrebbe trovare giustificazione per il loro probabile ruolo di anticorpi naturali, regolatori della risposta immunitaria innata ma anche adattativa e nel reclutamento di cellule infiammatorie.

In tal senso, Hu et al. (2012) hanno dimostrato che cellule epiteliali normali di topo possono produrre Ig, soprattutto IgM, con attività di anticorpi naturali, la cui produzione viene incrementata in conseguenza del contatto con l'antigene, come accade in corso di infezioni batteriche (Hu et al., 2012; Jiang et al., 2015).

Anche per quanto riguarda condizioni parafisiologiche, come l'allattamento, si è sempre creduto che le Ig rilevate nel colostro di mammiferi derivassero dal siero o fossero secrete dalle cellule immunitarie presenti nella ghiandola mammaria; invece, il recente riscontro di riarrangiamenti dei geni che codificano per le Ig in cellule epiteliali mammarie iperplastiche, confermati da dati sperimentali in topi in allattamento, ha suggerito che la presenza di queste cellule nel colostro è almeno parzialmente derivante da una produzione endogena delle cellule epiteliali della ghiandola mammaria (Zhang et al., 2010).

Per quanto riguarda i fenomeni neoplastici, la presenza d' immunoglobuline è stata riscontrata in numerose tipologie di derivazione epiteliale, mediante positività immunoistochimica di membrana o citoplasma, in cellule tumorali e in cellule normali adiacenti alla neoplasia nel carcinoma esofageo (Zhu et al., 2008) o esclusivamente nelle cellule carcinomatose nei tumori uroteliali(Liang et al., 2013).

Qui et al nel 2003, per la prima volta, e successivamente altri gruppi di ricercatori, hanno svelato la presenza di Ig in tumori epiteliali umani, tra cui i tumori del polmone, della cavità orale, dell'esofago, del fegato, della prostata, del seno e della cervice uterina (Qiu et al., 2003; Hu et al., 2012).

Nonostante il ruolo e il significato biologico della presenza di Ig in cellule neoplastiche non sia ancora chiarito, è stato suggerito che la produzione di immunoglobuline possa essere vantaggiosa per le cellule tumorali, in quanto le Ig associate al tumore avrebbero un ruolo protettivo nella fuga dall'immunosorveglianza tumorale.

Ci possono essere diverse ipotesi per spiegare la presenza di Ig nelle cellule tumorali, infatti potrebbe trattarsi della presenza di un legame recettoriale specifico dell'anticorpo presente sulle cellule neoplastiche, la diffusione attiva oppure la produzione endogena.

Recentemente, l'espressione di mRNA codificante per IgG in cellule neoplastiche mammarie, mediante ibridazione in situ, dimostra l'effettiva produzione endogena tuttavia, ciò non esclude che la loro presenza possa anche essere il risultato di un assorbimento di Ig prodotte da cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale (Yang et al., 2013).

Inoltre è stato dimostrato che le IgG e le IgA derivate da cellule neoplastiche non B umane sono coinvolte nella sopravvivenza e nella proliferazione delle stesse cellule (Hu et al., 2012). Infatti, il blocco delle IgA si è dimostrato capace di inibire la proliferazione e la vitalità delle cellule neoplastiche, mentre, il blocco delle IgG tumore-derivate sembrerebbe indurrebbe apoptosi sopprimendone la crescita tumorale in vitro ed in xenotrapianti in vivo (Hu et al., 2008).

Il riscontro di immunoglobuline, IgG o IgA, associate al tumore potrebbe essere interpretato come una forma di risposta umorale dell'ospite alla crescita del cancro; infatti è stato dimostrato che le Ig reattive nei confronti dei tumori sono capaci di legarsi ad antigeni normali o associati a cellule tumorali, inclusi quelli di membrana e delle proteine intracellulari e che il livello di espressione di IgG potrebbe essere correlato positivamente con una bassa differenziazione delle cellule tumorali (Liao et al., 2015).

In particolare, l'espressione di IgG è stata correlata sia all'architettura e all'arrangiamento delle cellule neoplastiche sia ai diversi istotipi di carcinoma mammario nella donna.

Come i risultati da noi riscontrati, le cellule tumorali singole, in piccoli nidi o cordoni isolati, mostrano una colorazione più intensa rispetto a quelle organizzate in grandi gruppi con disposizione sinciziale e che l'espressione di IgG sia direttamente proporzionale al grado di malignità, sebbene è stata rilevata una positività intensa anche nelle aree iperplastiche e una diminuzione di IgG nelle tipiche papille della forma maligna del carcinoma micropapillare.

Infatti, nella donna, neoplasie maligne come ILC (carcinoma infiltrante lobulare) e IDC (carcinoma infiltrante disseminato) hanno mostrato un'espressione significativamente maggiore di IgG rispetto a forme meno aggressive come MC (carcinoma midollare) e CIS (carcinoma in situ), così come alle lesioni benigne, incluse quelle con proliferazione epiteliale, come fibroadenomi e iperplasia mammaria.

Inoltre, l'espressione di IgG risulta associata, non solo, alla tipologia di crescita e alla malignità delle neoplasie al seno, ma anche alla presenza di metastasi ascellari, nella donna (Yang et al., 2013).

Questi risultati sono sovrapponibili anche con altre tipologie epiteliali neoplastiche come il carcinoma a cellule squamose dell'esofago (Zhang et al., 2012).

Infine, l'immunofluorescenza con anticorpi anti-IgG era riscontrabile sia nelle ghiandole epatoidi normali che nelle proliferazioni neoplastiche, sebbene con maggiore intensità e distribuzione nelle lesioni maligne rispetto i corrispettivi marcati per le IgM o IgA.

Similmente alla presenza di IgG, sembra essere un fenomeno frequente anche la presenza di IgA, sia in cellule ghiandolari epiteliali normali o iperplastiche sia nel carcinoma mammario della donna; ciò, oltre alla probabile produzione endogena, potrebbe trovare spiegazione nell'assorbimento attivo di IgA1 grazie alla possibile presenza dei recettori Fc

α RI (CD89), possibilmente presenti sulle cellule tumorali che ne permettono l'assorbimento e l'interiorizzazione.

Analogamente a quanto da noi evidenziato, per quanto concerne le IgA, è stata effettuata una correlazione tra positività, malignità e invasività della neoplasia nella specie umana in cui neoplasie classificate come invasive risultavano mostrare positività più intensa rispetto a quelle classificate come carcinomi in situ (Welinder et al., 2013) mentre neoplasie dal comportamento biologico poco aggressivo, come i carcinomi delle ghiandole epatoidi mostravano una ridotta positività a piccoli gruppi di cellule. Inoltre la presenza di IgA in ghiandole epatoidi normali o iperplastiche, in contrasto con i dati riscontrati da Nara et al. (2013), potrebbero invece suggerire un loro ruolo come agenti protettivi per preservare l'integrità della regione anale (Nara et al., 2013).

Anche le IgM, sebbene meno studiate, sono espresse con elevata frequenza nelle cellule tumorali epiteliali umane piuttosto che nell'epitelio normale, suggerendo che quelle derivate dal cancro possano essere coinvolte nell'oncogenesi e potrebbero controllare direttamente la sopravvivenza e la proliferazione delle stesse cellule.

Diversamente da quanto descritto nella donna abbiamo riscontrato positività lieve o assente nei diversi istotipi di tumori mammari canini da noi considerati, mentre è stata riscontrata una positività omogenea delle cellule epatoidi sia nella ghiandola normale così come nelle lesioni benigne e maligne, con medesima localizzazione intracitoplasmatica delle IgA.

Similmente alle IgM delle cellule B, è stato dimostrato, mediante tecniche con RT-PCR e Western Blot e Immunofluorescenza, che l'IgM sulla superficie delle cellule epiteliali umane neoplastiche co-localizza con CD79, per formare un complesso BCR-simile.

Inoltre, osservazioni che le IgM sono espresse con elevata frequenza nelle cellule tumorali epiteliali umane piuttosto che nell'epitelio normale suggerisce che IgM derivate dal cancro possano essere coinvolti nella tumorigenesi.

Esistono almeno due possibilità per questa osservazione: la prima possibilità è che le IgM espresse dalle cellule epiteliali neoplastiche ne controllino direttamente la sopravvivenza e la proliferazione, come sostenuto dalla constatazione che il siRNA della catena pesante della IgM ha indotto apoptosi in linee cellulari di cancro; la seconda possibilità è che IgM derivate dal cancro promuovano la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali attraverso un meccanismo innato immunitario-simile (Hu et al., 2012; Welinder et al., 2013).

Nel nostro studio è stata rilevata anche una positività epiteliale al CD79. Il CD79a è una proteina transmembrana, che con CD79b, forma un eterodimero che costituisce la frazione di trasduzione del segnale del BCR (B-Cell receptor) dopo il legame con le immunoglobuline IgA, IgM, IgD e IgE. CD79a si esprime nelle primissime fasi di sviluppo delle cellule B, fino all'ultimo stadio di maturazione, compresa la differenziazione in plasmacellule. Il ruolo del dimero CD79a/b è di trasmettere il segnale generato dal legame dell'antigene al BCR, e di innescare una cascata di reazioni di trasduzione del segnale che porta alla riorganizzazione del citoscheletro e a cambiamenti nell'espressione genica che influenzano il destino delle cellule B. Come per le Ig, si pensava che l'espressione di CD79 fosse fortemente specifica per le cellule B. Luger e collaboratori, hanno inaspettatamente

riscontrato l'espressione di CD79 in cellule mieloidi infiltranti tumori, quali cancro al seno e al polmone, sia in modelli murini sia umani, suggerendone il potenziale ruolo di nuovo bersaglio per la terapia del cancro. Sembrerebbe che l'attivazione di CD79a possa favorire l'oncogenesi secondo diversi meccanismi, quali il mantenimento del fenotipo immaturo in cellule neoplastiche, l'effetto immunosoppressivo sulla proliferazione delle cellule T, la sollecitazione della migrazione cellulare, la metastatizzazione e l'induzione della secrezione di citochine pro-oncogene (Luger et al., 2013).

Mediante studi d'immunoistochimica e immunofluorescenza con anticorpi specifici per la specie canina, abbiamo riscontrato che i tumori delle ghiandole epatoidei esprimono positività epiteliale per CD79a, IgG, IgA e IgM, mentre i tumori mammari esprimono positività per CD79a, IgG, IgA ma non per IgM.

Inoltre paragonando l'espressione epiteliale del CD79a e le Immunoglobuline è stato possibile evidenziare la sovrapposizione, dell'aumento o diminuzione di positività, tra CD79a, IgA e IgM, al contrario, la positività appare inversamente proporzionale tra CD79a e IgG nella ghiandola mammaria, probabilmente dovuto al fatto che il recettore non forma il BCR con le IgG.

Nelle aree di iperplasia della ghiandola mammaria è stato possibile osservare una positività maggiore di IgG rispetto ad IgA, IgM e Cd79a, al contrario, nel carcinoma, ad una diminuzione delle IgG in alcuni istotipi, come il carcinoma micropapillare, corrisponde un aumento di intensità di CD79 e di IgA.

Similmente nelle ghiandole epatoidi, nonostante un aumento omogeneo di CD79a e IgA, IgM e IgG, nelle forme maligne si osserva un intenso aumento di IgG e una diminuzione sovrapponibile per CD79a e IgA, sebbene le IgM rimangano invariate.

Inoltre nelle ghiandole epatoidi l'aumento nelle zone infiltranti di Plasmacellule sembrerebbe coincidere con l'espressione epiteliale, fortuitamente evidenziata, di CD79, IgA e IgM, così come coincide la diminuzione di plasmacellule intratumorali e di CD79a, IgA e di IgM epiteliali, rispetto alle lesioni benigne, nel carcinoma epatoide indifferenziato;

Nelle aree iperplastiche della mammella, invece, la diminuzione di plasmacellule coincide con una diminuzione di positività epiteliale a CD79 e IgA, mentre quella a IgG sembrerebbe aumentata, al contrario nello stroma peritumorale e, sebbene in misura minore in quello intratumorale, degli istotipi maligni vi è un aumento di plasmacellule e positività epiteliale a CD79 e IgA e una diminuzione di quella alle IgG.

Da queste considerazioni si deduce che il grado di malignità della neoplasia sembra essere correlato all'espressione epiteliale di Ig.

Nonostante la conferma della produzione di Ig in cellule tumorali non ematopoietiche, la loro funzione e il loro significato clinico nello sviluppo e nell'eventuale approccio terapeutico al cancro rimane ancora da esplorare, così come rimane ancora sconosciuto se le classiche funzioni delle Ig delle cellule B, coincidono con quelle delle Ig derivate da cellule tumorali.

E' indubbio che questa intrigante scoperta consente di svelare nuovi aspetti delle funzioni immunitarie delle immunoglobuline in molti tipi di cellule normali o anormali (Chen et al., 2009; Hu et al., 2012).

Per la prima volta in questo lavoro di tesi viene descritta la positività alle Ig in due tumori epiteliale del cane caratterizzati da differente comportamento biologico.

I dati da noi riscontrati, per la prima volta in Medicina Veterinaria, sono conformi a quanto valutato su neoplasie al seno della donna riguardo la positività alle Ig, mentre non esistono dati in letteratura circa la positività alle immunoglobuline nelle ghiandole epatoidi.

La localizzazione soprattutto a carico dei lobuli normali o iperplastici/adenomatosi e la positività riscontrata solo in cellule isolate nell'ambito dei carcinomi ci porta a speculare sull'attività difensiva che le ghiandole epatoidi probabilmente esplicano in una zona ad elevato inquinamento batterico come quella perianale.

Conclusioni

I tumori solidi si distinguono dalle neoplasie ematologiche per la presenza di uno stroma che contiene significativi elementi capaci di promuovere o inibire la crescita del tumore, quindi, non può essere escluso il ruolo che le immunoglobuline, i loro recettori e le cellule immunitarie stromali potrebbero avere nella progressione neoplastica e ulteriori dati sono necessari per stabilirne l'effettiva importanza (Soto and Sonnenschein, 2013).

Una strategia multifocale basata sull'utilizzo di combinazioni terapeutiche allo scopo di manipolare l'ambiente immunitario a svantaggio del tumore fa grandi promesse, mentre approcci strettamente specifici potrebbero essere solo in grado di realizzare benefici limitati per la maggior parte dei pazienti trattati (Nicodemus, 2015).

Recentemente l'immunoterapia del cancro è stata messa sotto i riflettori da numerosi gruppi di ricercatori.

Certamente una migliore comprensione delle dinamiche delle risposte immunitarie antitumorali (Cancer-Immunity Cycle) è di fondamentale importanza per l'ulteriore sviluppo di questa forma di trattamento, inoltre, queste stesse risposte possono essere inibite in diversi modi differenti che variano da paziente a paziente.

Il rapido progresso nella comprensione molecolare della biologia del cancro e dell'interazione ospite-tumore ha definito una nuova serie di obiettivi per lo sviluppo di anticorpi.

Ciò implica che l'approccio all'immunoterapia del cancro deve anche essere personalizzato, rivoluzionando così i trattamenti terapeutici standard del cancro, in modo da identificare i fattori limitanti propri del paziente, individuando e combinando le varie strategie per superare questi ostacoli.

Sembrerebbe che le cellule tumorali esprimano proteine mutate, note come neoantigeni che possono essere riconosciuti dal sistema immunitario oppure, come nel nostro caso di immunoglobuline prodotte dal tumore, sfuggire ai normali meccanismi di difesa.

L'immunoterapia del futuro sarà, dunque, basata su meccanismi immunosoppressori paziente-specifici e mirerà a colpire non solo lo stesso tumore, ma anche a modulare le cellule e i tessuti circostanti così da ridurre la soppressione immunitaria e promuovere un attacco mirato (Kakimi, 2016).

La tecnologia degli anticorpi monoclonali rimane uno strumento di primo piano e di vantaggio terapeutico per modulare i meccanismi immunitari.

Inoltre, gli anticorpi possono essere utilizzati per antagonizzare o stimolare percorsi ormonali, citochine e chemochine, per modificare il riconoscimento dell'antigene, la

captazione e presentazione, e per aiutare a guidare specifici effettori cellulari della risposta immunitaria verso un sito selezionato e quindi spostare l'equilibrio dell'omeostasi immunitaria.

L'uso sapiente degli anticorpi monoclonali per un intento terapeutico dovrebbe essere combinato con altre molecole, coadiuvanti e agenti chemioterapici in modo programmato e coordinato.

L'applicazione di un potenziale futuro trattamento personalizzato del cancro, che miri sia al tumore sia all'ambiente stromale, dipende da una sofisticata comprensione dell'interazione tra un tumore in crescita, il tessuto locale in cui risiede e l'evoluzione della risposta immunitaria dell'ospite.(Nicodemus, 2015).

La maggior parte delle ricerche in corso sui meccanismi del cancro umano vengono eseguiti utilizzando topi così come i trattamenti. I modelli murini di cancro hanno diversi vantaggi, possono essere rapidamente propagati, sono poco costosi, tuttavia, hanno delle limitazioni essenziali: mentre i tumori negli esseri umani nascono spontaneamente, nei topi devono essere indotti da tossine ambientali o modifiche genetiche (Rowell et al., 2011).

Al contrario, i cani condividono con l'uomo lo stesso ambiente e sviluppano, analogamente, tumori spontanei, rappresentando una preziosa risorsa nell'ambito della ricerca.

Inoltre, le diverse tipologie di cancro diagnosticate nel cane mostrano caratteristiche simili alla controparte umana rispetto ai modelli murini, in termini epidemiologici, istopatologici, di comportamento biologico, dipendenza ormonale e alterazioni genetiche (Sorenmo et al., 2009).

E' importante sottolineare che, mentre negli studi clinici umani la valutazione di intervallo libero da malattia o la sopravvivenza richiede solitamente diversi anni, informazioni simili provenienti da studi clinici nei cani in genere richiedono molto meno tempo, talvolta anche solo pochi mesi.

Infatti, l'ultima tendenza nel campo delle biotecnologie è quello di testare farmaci e vaccini in animali da compagnia prima di iniziare studi clinici umani (Sinha, 2014).

Tra l'altro, la mancanza in medicina veterinaria di "gold standard" nel trattamento terapeutico permette di testare precocemente le terapie destinate all'uomo e i trial clinici possono essere completati rapidamente a causa della rapida progressione e precoce metastatizzazione osservabili nel cane e nel gatto. Tuttavia, non sono neanche trascurabili, negli studi di efficacia preclinical sui pets: il sistema immunitario dell'ospite e le interazioni tra i vari tumori e il microambiente stromale, l'insorgenza spontanea e la resistenza di ciascun individuo; ciò nonostante, in molti casi l'inserimento di cani affetti da cancro nel percorso di sviluppo preclinico di terapie antineoplastiche, ha influenzato in maniera decisiva il risultato contribuendo a stabilire relazioni di farmacocinetica/farmacodinamica, la dose/regime, la tossicità clinica attesa, e in ultima analisi, il potenziale di attività biologica (Gardner et al., 2016).

Il campo interdisciplinare dell'oncologia comparativa offre un'opportunità unica per incrementare le conoscenze dei meccanismi neoplastici; approfondire, proiettarsi ed approcciarsi alla medicina traslazionale e comparativa, ponte tra scienza e medicina, rappresenta oggi la base per il trattamento contro il cancro con maggiore probabilità di successo.

La possibilità per i ricercatori, in medicina umana e in veterinaria, di combinare i loro risultati scientifici in modo rapido, ampliando così le conoscenze sulle origini del cancro e sperimentando nuove terapie, comporta un duplice beneficio e obiettivo: la cura dell'uomo e del suo fedele amico cane.

Bibliografia

1. Adjei I.M., Blanka S. 2015. Modulation of the Tumor Microenvironment for Cancer Treatment: A Biomaterials Approach. *J. Funct. Biomater.*, 6, 81-103
2. Arai K., Teratani T., Nozawa R., Yamada T. 2001. Immunohistochemical investigation of S100A9 expression in pulmonary adenocarcinoma: S100A9 expression is associated with tumor differentiation. *Oncol Rep* 8, 591–596.
3. Arai K., Takano S., Teratani T., Ito Y., Yamada T. 2008. S100A8 and S100A9 overexpression is associated with poor pathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. *Curr Cancer Drug Targets* 8, 243–252
4. Arai K., Yamada T., Nozawa R. 2000. Immunohistochemical investigation of migration inhibitory factor-related protein (MRP)-14 expression in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 17, 183–188.
5. Ayala F J. 1968. Biology as an autonomous science. *Am Sci.* 56:207–221.
6. Ammirante M., Luo J.L., Grivennikov S., Nedospasov S., Karin M. 2010. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature.* 464(7286):302-305.
7. Ammendola M., Sacco R., Sammarco G., Luposella M., Patruno R., Gadaleta C.D., Sarro G.D., Ranieri G. 2016. Mast Cell-Targeted Strategies in Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother.* 43(2):109-13.
8. Ansell S.M., Lesokhin A.M., Borrello I., Halwani A., Scott E.C., Gutierrez M., Schuster S.J., Millenson M.M., Cattry D., Freeman G.J., Rodig S.J., Chapuy B., Ligon A.H., Zhu L., Grosso J.F., Kim S.Y., Timmerman J.M., Shipp M.A., Armand P. 2015. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 372(4):311-319.
9. Atoji Y., Yamamoto Y., Komatsu T., Suzuki Y., Tsubota T. 1998. Circumanal glands of the dog: a new classification and cell degeneration. *Anat Rec* 250, 251-267.

10. Beha G., Sarli G., Brunetti B., Sassi F., Ferrara D., Benazzi C. 2012. Morphology of the myoepithelial cell: immunohistochemical characterization from resting to motile phase. *Scientific World Journal*. 2012:252034.
11. Beirão Breno C.B., Teresa Raposo, Pang Lisa Y. and Argyle D. J. 2015. Canine mammary cancer cells direct macrophages toward an intermediate activation state between M1/M2BMC *Veterinary Research*. 11:151
12. Benito-Martin A., Di Giannatale A, Ceder S., Peinado H. 2015. The New Deal: A Potential Role for Secreted Vesicles in Innate Immunity and Tumor Progression. *Frontiers in Immunology*. 6:66.
13. Berntsson J., Nodin B., Eberhard J., Micke P., Jirström K. 2016. Prognostic impact of tumour-infiltrating B cells and plasma cells in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 139(5):1129-39.
14. Birnbaum D., Bertucci F., Ginestier C., Tagett R., Jacquemier J., Charafe-Jauffret E. 2004. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? *Int J Oncol*. 25, 249–258.
15. Biswas A., Richards J.E., Massaro J., Mahalingam M. 2014. Mast cells in cutaneous tumors: innocent bystander or maestro conductor? *Int J Dermatol*. 53(7):806-11.
16. Bizzarri M, Cucina A, Biava PM, Proietti S, D'Anselmi F, Dinicola S, Pasqualato A, Lisi E. 2011. Embryonic morphogenetic field induces phenotypic reversion in cancer cells. *Curr Pharm Biotechnol*. 12:243–253.
17. Bizzarri M, Cucina A. 2014. Tumor and the Microenvironment: A Chance to Reframe the Paradigm of Carcinogenesis? *BioMed Research International*. 2014:934038.
18. Boveri T. 1914. *Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren*. Fischer, Jena.
19. Boveri T. 1929. *The Origin of Malignant Tumors*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
20. Brodt P., Gordon J. 1978. Anti-tumor immunity in B lymphocyte-deprived mice. I. Immunity to a chemically induced tumor. *J Immunol*. 121(1):359–62.
21. Burnet FM. 1970. *Immunological surveillance*, Oxford, Pergamon Press.

22. Bussard K.M., Boulanger C.A., Booth B.W., Bruno R.D., Smith G.H. 2010. Reprogramming human cancer cells in the mouse mammary gland. *Cancer Res.* 70, 6336-6343.
23. Chen Z., Qiu X., Gu J. 2009. Immunoglobulin expression in non-lymphoid lineage and neoplastic cells. *Am J Pathol* 174,1139-1148.
24. Dahlin J.S., Hallgren J. 2015. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. *Mol. Immunol.* 63(1),9-17.
25. Daëron M. 2016. Innate myeloid cells under the control of adaptive immunity: the example of mast cells and basophils. *Curr Opin Immunol.* 38, 101-108.
26. da Silva E.Z., Jamur M.C., Oliver C. 2014. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem.*
27. de Groot J.F., Fuller G., Kumar A.J., Piao Y., Eterovic K., Ji Y., Conrad C.A. 2010. Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro-Oncology.* 12(3):233–242.
28. de Mora F., Puigdemont A., Torres R. 2006. The role of mast cells in atopy: what can we learn from canine models? A thorough review of the biology of mast cells in canine and human systems. *Br J Dermatol.* 155(6), 1109-1123.
29. DeNardo D.G., Barreto J.B., Andreu P., Vasquez L., Tawfik D., Kolhatkar N., Coussens L.M. 2009. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell.* 16,91–102.
30. Deol Y.S., Nasser M.W., Yu L., Zou X., Ganju R.K. 2011. Tumor-suppressive effects of psoriasin (S100A7) are mediated through the beta-catenin/T cell factor 4 protein pathway in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *J Biol Chem* 286, 44845–44854.
31. Dow S.W., Olson P.N., Rosychuk R.A., Withrow S.J. 1988. Perianal adenomas and hypertestosteronemia in a spayed bitch with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 192,1439-1441.

32. Duan L., Wu R., Ye L. 2013. S100A8 and S100A9 Are Associated with Colorectal Carcinoma Progression and Contribute to Colorectal Carcinoma Cell Survival and Migration via Wnt/ β -Catenin Pathway. Sun J, ed. PLoS ONE. 8(4):e62092
33. Duda D.G., Duyverman A.M., Kohno M., Snuderl M., Steller E.J., Fukumura D., Jain R.K. 2010 Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(50):21677-2682.
34. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 3, 991-998.
35. Ehrlich P. 1897. *Arch Anat Physiol (Leipzig)*. 571–579.
36. Ehrlich P. 1909. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Ned Tijdschr Geneesk. 5, 273-290.
37. Elinav E., Nowarski R., Thaiss C.A., Hu B., Jin C., Flavell R.A. 2013. Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. Nature Reviews Cancer.
38. Elzagheid A., Buhmeida A., Korkeila E., Collan Y., Syrjanen K. 2008. Nuclear beta-catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma. World J Gastroenterol 14, 3866–3871.
39. Enzler T., Kater A.P., Zhang W, Widhopf G.F., Chuang H.Y., Lee J., Avery E., Croce C.M., Karin M., Kipps T.J. 2009. Chronic lymphocytic leukemia of TCL1 transgenic mice undergoes rapid cell turnover that can be offset by extrinsic CD257 to accelerate disease progression. Blood. 114, 4469–4476.
40. Fidler I.J. 1973. The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. Eur J Cancer. 9(3), 223–227.
41. Foley E.J. 1953. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. Cancer Res. 13, 835-837.
42. Gama A. 2011. A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissue. Vet J. 190,303–304.
43. Gardner H.L., Fenger J.M., London C. 2016. Dogs as a Model for Cancer. Annu Rev Anim Biosci. 4, 199-222.

44. Gilbert S.F., Sarkar S. 2000. Embracing complexity: Organicism for the 21st century. *Developmental Dynamics* 219, 1-9.
45. Goyette J., Geczy C.L. 2011. Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function. *Amino Acids* 41, 821–842.
46. Goldschmidt M., Peña L., Rasotto R., Zappulli V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 48(1),117-131.
47. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell.* 140(6), 883-899.
48. Hayes H.M. Jr., Wilson G.P. 1977. Hormone-dependent neoplasms of the canine perianal gland. *Cancer Res* 37, 2068-2071.
49. Hanahan D., Weinberg R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100, 57–70.
50. Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144, 646–674.
51. Hu F., Zhang L., Zheng J. 2012. Spontaneous production of immunoglobulin M in human epithelial cancer cells. *PLoS One* 7:e51423.
52. Hu D., Zheng H., Liu H. 2008. Immunoglobulin expression and its biological significance in cancer cells. *Cell Mol Immunol.* 5, 319-324.
53. Im K.S., Kim J.H., Yhee J.Y., Yu C.H., Kim N.H., Nho W.G., Sur J.H. 2011. Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in canine mammary carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, 144, 157-163.
54. Ito Y., Arai K., Nozawa R., Yoshida H., Hirokawa M. 2009. S100A8 and S100A9 expression is a crucial factor for dedifferentiation in thyroid carcinoma. *Anticancer Res* 29: 4157–4161.
55. Iwata Y., Matsushita T., Horikawa M., Dilillo D.J., Yanaba K., Venturi G.M., Szabolcs P.M., Bernstein S.H., Magro C.M., Williams A.D., Hall R.P., St Clair E.W., Tedder T.F. 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 117(2), 530-541.
56. Jiang D., Ge J., Liao Q. 2015. IgG and IgA with potential microbial-binding activity are expressed by normal human skin epidermal cells. *Int J Mol Sci* 16, 2574-2590.

57. Johansson J., Tabor V., Wikell A., Jalkanen S. and Fuxe J. 2015. TGF- β 1 induced epithelial mesenchymal transition promotes monocyte/macrophage properties in breast cancer cells *Frontiers in oncology*. 5,3.
58. Kakimi K., Karasaki T., Matsushita H. 2016. Advances in personalized cancer immunotherapy. *Breast Cancer* ahead of print
59. Kasemeier-Kulesa J.C., Teddy J.M., Postovit L.M., Seftor E.A., Seftor R.E., Hendrix M.J., Kulesa P.M. 2008. Reprogramming multipotent tumor cells with the embryonic neural crest microenvironment. *Dev. Dyn.* 237, 2657-2666.
60. Kroć I.M., Mucha J., Majchrzak K., Homa A., Bulkowska M., Majewska A, Gajewska M., Pietrzak M., Perszko M., Romanowska K., Pawłowski K., Manuali E., Hellmen E., Motyl T. 2014. Macrophages Mediate a Switch between Canonical and Non-Canonical Wnt Pathways in Canine Mammary Tumors. *PLoS ONE* 9(1): e83995.
61. Knief J., Reddemann K., Petrova E., Herhahn T., Wellner U., Thorns C. 2016. High Density of Tumor-infiltrating B-Lymphocytes and Plasma Cells Signifies Prolonged Overall Survival in Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction. *Anticancer Res.* 36(10):5339-5345.
62. Laland K., Uller T., Feldman M., Sterelny K., Müller G.B., Moczek A., Jablonka E., Odling-Smee J., Wray G.A., Hoekstra H.E., Futuyma D.J., Lenski R.E., Mackay T.F., Schluter D., Strassmann J.E. 2014. Does evolutionary theory need a rethink? *Nature*. 514(7521), 161–164.
63. Lavallo G.E., Bertagnolli A.C., Tavares W.L.F., Ferreira M.A.N.D., Cassal G.D. 2010. Mast cells and angiogenesis in canine mammary tumor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62(6), 1348-1351.
64. Liang P.Y., Li H.Y., Zhou Z.Y. 2013. Overexpression of immunoglobulin G prompts cell proliferation and inhibits cell apoptosis in human urothelial carcinoma. *Tumour Biol.* 34, 1783-1791.
65. Luger D., Yang Y.A., Raviv A. 2013. Expression of the B-cell receptor component CD79a on immature myeloid cells contributes to their tumor promoting effects. *PLoS One* 8:e76115.

66. Maffini M.V., Calabro J.M., Soto A.M., Sonnenschein C. 2005. Stromal regulation of neoplastic development: Age-dependent normalization of neoplastic mammary cells by mammary stroma. *Am. J. Pathol.* 167, 1405-1410
67. Maffini M.V., Soto A.M., Calabro J.M., Ucci A.A., Sonnenschein C. 2004. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *Journal of Cell Science.* 117(8), 1495–1502.
68. Malbec O, Daëron M. 2007. The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation. *Immunol Rev.* 217, 206-221.
69. McCullough A.R., Coleman W.B., Smith G.J., Grisham J.W. 1997. Age-dependent induction of hepatic tumor regression by the tissue microenvironment after transplantation of noplastically transformed rat liver epithelial cells into the liver. *Cancer Res.* 57, 1807- 1873.
70. Misdorp W. 2002. Tumors of the mammary gland. In: Meuten D.J., ed. *Tumors in Domestic Animals.* 4th ed. Ames: Iowa State Press. 575–606, 764.
71. Monach P.A., Schreiber H., Rowley D.A. 1993. CD4+ and B lymphocytes in transplantation immunity. II. Augmented rejection of tumor allografts by mice lacking B cells. *Transplantation.* 55(6), 1356–1361.
72. Mukaratirwa S., Chikafa L., Dliwayo R., Moyo N. 2006 (a). Mast cells and angiogenesis in canine melanomas: malignancy and clinicopathological factors. *Vet Dermatol,* 17, 141-146.
73. Mukaratirwa S., Chiwome T., Chitanga S., Bhebhe E. 2006 (b). Canine transmissible venereal tumour: assessment of mast cell numbers as indicators of the growth phase. *Vet Res Commun,* 30, 613-621.
74. Needham J. 1936. New advances in chemistry and biology of organized growth. *Proc. Roy. Soc. B.* 29, 1577- 1626.
75. Nicodemus C.F. 2015. Antibody-based immunotherapy of solid cancers: progress and possibilities. *Immunotherapy.* 7, 923-939.
76. Niu N., Zhang J., Guo Y. 2011. Expression and distribution of immunoglobulin G and its receptors in the human nervous system. *Int J Biochem Cell Biol.* 43, 556-563.

77. Noy R., Pollard J.W. 2014. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41(1), 49–61.
78. Nara T., Yasui T., Fujimori O., Meyer W., Tsukise A 2013. Histochemical analyses of anti-microbial substances in canine perianal skin with special reference to glandular structures. *Anat Histol Embryol* 42, 105-113.
79. Ning X., Sun S., Zhang K., Liang J., Chuai Y. 2012. S100A6 protein negatively regulates CacyBP/SIP-mediated inhibition of gastric cancer cell proliferation and tumorigenesis. *PLoS One* 7: e30185.
80. Oldford S.A., Marshall J.S. 2015. Mast cells as targets for immunotherapy of solid tumors. *Mol Immunol.* 63(1),113-24.
81. Ou Z., Wang Y., Liu L., Li L., Yeh S., Qi L., Chang C. 2015. Tumor microenvironment B cells increase bladder cancer metastasis via modulation of the IL-8/androgen receptor (AR)/MMPs signals. *Oncotarget.* 6(28), 26065-26078.
82. Paolino M., Penninger J.M. 2016. The Role of TAM Family Receptors in Immune Cell Function: Implications for Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* 8(10). pii: E97.
83. Pérez J., Day M.J., Mozos E. 1998. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Vet Immunol Immunopathol.* 64(2), 133-147.
84. Petterino C., Martini M., Castagnaro M. 2004. Immunohistochemical detection of growth hormone (GH) in canine hepatoid gland tumors. *J Vet Med Sci* 66, 569-572.
85. Pierce G.B., Shikes R., Fink L.M. 1978. *Cancer: A Problem of Developmental Biology.* Prentice-Hall, Englewoods Cliffs, NJ.
86. Pisani G., Millanta F., Lorenzi D., Vannozzi I., Poli A. 2006. Androgen receptor expression in normal, hyperplastic and neoplastic hepatoid glands in the dog. *Res Vet Sci* 81, 231-236.
87. Pittoni P., Colombo M.P. 2012. The Dark Side of Mast Cell-Targeted Therapy in Prostate Cancer. *Cancer Res* 72, 831-835.
88. Pollard J.W. 2004. Tumor educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 4, 71–78.

89. Pen˜a L., Gama V., Goldschmidt M.H., Abadie J., Benazzi C., Castagnaro M., Di'ez L., Ga'rtner F., Hellme'n E., Kiupel M., Milla'n Y., Miller M. A., Nguyen F., Poli A., Sarli G., Zappulli V., Marti'n de las Mulas J. 2014. Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 51(1), 127-145.
90. Qian B.Z., Pollard J.W. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 141, 39–51.
91. Qiu X., Zhu X., Zhang L. 2003. Human epithelial cancers secrete immunoglobulin g with unidentified specificity to promote growth and survival of tumor cells. *Cancer Res.* 63, 6488-6495.
92. Raposo T., Greg'rio H., Pires I., Prada J., Queiroga F.L. 2014. Prognostic value of tumour-associated macrophages in canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol.* 12(1)
93. Ribatti D. 2016. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget*, Advance Publications www.impactjournals.com/oncotarget/
94. Ribatti D. 2013. Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis. *Immunol Lett.* 152(2), 83-88.
95. Riley J.F. 1968. Mast cells, co-carcinogenesis and anti-carcinogenesis in the skin of mice. *Experientia.* 24(12), 1237-1238.
96. Rowell J.L., McCarthy D.O., Alvarez C.E. 2011. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends in Molecular Medicine.* 17(7), 380-388.
97. Schioppa T. 2011. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF-alpha during squamous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(26), 10662–10667.
98. Schwartz M., Zhang Y., Rosenblatt J.D. 2016. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *J Immunother Cancer.* 19;4:40.
99. Sfacteria A., Lanteri G., Grasso G., Macri B., Mazzullo G. 2011. Mast cells in caninemammary gland tumour: number, distribution and EPOR positivity. *Veterinary and Comparative Oncology.* 9(4), 310-315.

100. Shabadash S.A., Zelikina T.I. 1998. Hepatoid glands of mammals: Prospects of comparative histological investigation of new skin gland type. *Zoologicheskyy Zhurnal* **77**, 30-47.
101. Sharma S.H. Thulasisingam S., Nagarajan S. 2016. Chemopreventive agents targeting tumor microenvironment. *Life Sciences*. 145, 74–84.
102. Siebenhaar F., Metz M., Maurer M. 2014. Mast cells protect from skin tumor development and limit tumor growth during cutaneous de novo carcinogenesis in a Kit-dependent mouse model. *Exp Dermatol*. 23(3), 159-164.
103. Sinha G. 2014. Companion therapeutics. *Nat Biotech*. 32(1), 12-14.
104. Sleek N., de Rooster H., Veldhuis Kroeze E.J., Van Ginneken C, Van Brantegem L. 2011. Canine mammary tumours, an overview. *Reprod Domest Anim*. 46,1112–1131.
105. Sonnenschein C., Soto A.M. 1999. *The Society of Cells: Cancer and Control of Cell Proliferation*. Springer Verlag, New York.
106. Sonnenschein C., Soto A.M. 2011. The death of the cancer cell. *Cancer Research* **71**, 4334-4337.
107. Sonnenschein C., Soto A.M. 2014. Competing views on cancer. *J Biosci*, 39(2), 281–302.
108. Sonnenschein C., Soto A.M. 2015. Cancer Metastases: So Close and So Far. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 107(11): djv236.
109. Sonnenschein C., Soto A.M. 2016. Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*.
110. Sorenmo K.U., Kristiansen V.M., Cofone M.A. 2009. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol*. 7, 162-172.
111. Sorenmo K.U., Rasotto R., Zappulli V., Goldschmidt M.H. 2011. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*. 48, 85–97.
112. Soto A.M., Sonnenschein C. 2011. The tissue organization field theory of cancer: A testable replacement for the somatic mutation theory. *BioEssays* 33, 332-340.

- 113.Soto A.M., Sonnenschein C. 2013. Paradoxes in Carcinogenesis: There Is Light at the End of That Tunnel! *Disrupt Sci Technol.* 1, 154-156.
- 114.Suemori T., Susumu N., Iwata T., Banno K., Yamagami W., Hirasawa A., Sugano K., Matsumoto E., Aoki D. 2015. Intratumoral CD8+ lymphocyte infiltration as a prognostic factor and its relationship with cyclooxygenase 2 expression and microsatellite instability in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 25(7), 1165-1172.
115. Takeya M., Komohara Y. 2016. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe?. *Pathology International* . 66, 491–505.
- 116.Triolo V.A. 1964. Nineteenth century foundations of cancer research origins of experimental research. *Cancer Res.* 24, 4-27.
- 117.Trivanović D., Krstić J., Djordjević I.O., Mojsilović S., Santibanez J.F., Bugarski D., Jauković A. 2016. The Roles of Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Tumor Microenvironment Associated with Inflammation Volume 2016, Article ID 7314016, 14
- 118.Varricchi G., Galdiero M.R., Marone G., Granata F., Borriello F., Marone G. 2016. Controversial role of mast cells in skin cancers. *Exp Dermatol.* Epub ahead of print.
- 119.Venmar K.T., Carter K.J., Hwang D.G., Dozier E.A., Fingleton B. 2014. IL-4 receptor ILR4 α regulates metastatic colonization by mammary tumors through multiple signaling pathways. *Cancer research.* 74(16), 4329-4340.
- 120.Waddington C.H. 1935. Cancer and the theory of organizers. *Nature* 135, 606-608.
- 121.Welinder C., Baldetorp B., Blixt O. 2013. Primary breast cancer tumours contain high amounts of IgA1 immunoglobulin: an immunohistochemical analysis of a possible carrier of the tumour-associated Tn antigen. *PLoS One* 8:e61749.
- 122.Wang R., Zhang J., Chen S., Lu M., Luo X., Yao S. 2011. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression, *Lung Cancer* 74, 188–196.
- 123.Wanitsuwan W., Kanngurn S., Boonpipattanapong T., Sangthong R., Sangkhathat S. 2008. Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. *World J Gastroenterol* 14, 6052–6059.

124. Wasiuk A., de Vries V.C., Hartmann K., Roers A., Noelle R.J. 2009. Mast cells as regulators of adaptive immunity to tumours. *Clin Exp Immunol.* 155(2), 140-146.
125. Weinberg, R.A. 2014. Coming full circle—from endless complexity to simplicity and back again. *Cell* 157, 267-271.
126. Westphal E. 1891. Über Mastzellen. In: Ehrlich P, ed. *Farbenanalytische Untersuchungen*. Berlin: Hirschwald. 17–41.
127. Woo JR et al. Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue. *J Transl Med.* 2014;12:30.
128. Wray J., Kalkan T., Smith A.G. 2010. The ground state of pluripotency. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1027-1032.
129. Ying Q.L., Wray J., Nichols J., Batlle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P., Smith A. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519-523.
130. Yu M., Bardia A., Wittner B.S., Stott S.L., Smas M.E., Ting D.T. 2013. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 339(6119), 580–584.
131. Zhang L., Hu S., Korteweg C. 2012. Expression of immunoglobulin G in esophageal squamous cell carcinomas and its association with tumor grade and Ki67. *Hum Pathol.* 43:423-434.
132. Zhang S., Mao Y., Huang J. 2010. Immunoglobulin gene locus events in epithelial cells of lactating mouse mammary glands. *Cell Mol Life Sci* 67:985-994.
133. Zhu X., Li C., Sun X. 2008. Immunoglobulin mRNA and protein expression in human oral epithelial tumor cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* .16,232-238.
134. Zhou X., Su Y.X., Lao X.M., Liang Y.J., Liao G.Q. 2016. CD19(+)IL-10(+) regulatory B cells affect survival of tongue squamous cell carcinoma patients and induce resting CD4(+) T cells to CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Oral Oncol.* 53, 27-35.

Indice

1	Abstract.....	3
2	Introduzione.....	7
2.1	Teorie sulla carcinogenesi.....	8
2.2	Teoria della mutazione somatica (SMT).....	9
2.3	Teoria dell'Organizzazione dei tessuti (TOFT).....	11
2.4	Teoria TOFT e Metastasi.....	16
2.5	Microambiente e Tumore.....	19
2.6	Microambiente, Immunoediting e Cancro.....	21
2.7	Macrofagi (TAMs) e Tumori.....	23
2.8	Mastociti (TAMCs) e Tumori.....	29
2.9	Cellule B, Plasmacellule e Tumori.....	33
2.10	Tipologie tumorali canine selezionate per lo studio.....	36
2.10.1	Tumori delle Ghiandole Epatoidi.....	36
2.10.2	Tumori delle Ghiandola Mammaria.....	41
3	Contributo sperimentale.....	44
3.1	Scopo della tesi.....	45
3.2	Materiali e Metodi.....	46

3.2.1	Tumori delle ghiandole epatoidi.....	52
3.2.2	Tumori Mammari.....	55
3.2.3	Colorazione istochimica e Immunoistochimica.....	60
3.2.4	Indagine Statistica.....	63
3.3	Risultati.....	64
3.4	Discussione e conclusioni.....	90
3.5	Bibliografia.....	110

