

MICROMETASTASI LINFONODALI NEI TUMORI MAMMARI MALIGNI DELLA CAGNA

°Sarli G., °Berton D., °Benazzi C., *Galeotti M., °Marcato P.S.

°Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bologna;

*Dipartimento di Scienze della Produzione Animale - Sezione di Biologia e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Udine.

INTRODUZIONE

Il concetto di “metastasi occulta” del linfonodo regionale nei tumori mammari maligni è stato inizialmente presentato da Shapir e Amromin nel 1948. Adottando la tecnica delle sezioni seriate colorate con ematossilina-eosina gli Autori riscontrarono, in una percentuale di donne portatrici di carcinoma della mammella, e graduate come linfonodo-negative, la presenza di cellule carcinomatose nel linfocentro ascellare originariamente considerato negativo. Il termine “metastasi occulta” è oggi sostituito dal termine “micrometastasi” ed è differente da quello, secondo noi improprio, di “macrometastasi”. Infatti Dowlatshai e coll. (1997) considerano micrometastasi quelle difficilmente identificabili con l’esame istologico di routine, e “macrometastasi” quelle facilmente identificabili. In ciò l’incongruenza del prefisso “macro” attribuito al rilievo mediante esame istologico. Nella presente nota le micrometastasi saranno intese e nominate secondo quanto definito da Dowlatshai e coll. (1997), mentre le “macrometastasi”, intese sempre secondo i sopracitati autori, saranno riferite semplicemente come metastasi.

Dalla prima segnalazione di Shapir e Amromin (1948) altri studi analoghi sono stati effettuati impiegando come metodo di rivelazione sezioni seriate e non, e più recentemente la metodica immunistochemica verso antigeni epiteliali (pancheratina, cocktail di citocheratine, antigene carcinoembrionario (CEA), antigene epiteliale di membrana (EMA)) o la RT-PCR verso l’mRNA della citocheratina 19, del CEA o verso l’oncogene c-erb B2 (Dowlatshahi et al., 1997). L’impulso per tali indagini nasceva soprattutto dal significato prognostico che esse potevano rivestire. Sembra oggi assodato che la presenza di micrometastasi peggiori sia l’intervallo libero da cancro che la sopravvivenza rispetto ai soggetti linfonodo-negativi (Dowlatshahi et al., 1997).

Nostre recenti indagini (Benazzi e coll., 1999; Galeotti e coll., 1998) sui tumori mammari maligni della cagna, che avevano lo scopo di valutare la sopravvivenza in funzione di diversi parametri, tra cui lo stadio istologico secondo Gilbertson e coll. (1983), hanno messo in evidenza un periodo post-operatorio significativamente più basso nei soggetti a stadio istologico II (presenza di emboli endovasali e/o coinvolgimento del linfonodo), rispetto ai soggetti a stadio istologico 0 (tumore maligno non infiltrante) o a stadio I (tumore maligno infiltrante con invasione stromale).

Nell'ambito di ogni gruppo, ma soprattutto negli stadi I e II, si sente l'esigenza di utilizzare altri parametri di graduazione, per definire meglio il rischio di recidiva o metastasi. Ai fini della sopravvivenza si sono rivelati utili, in tal senso, il grado nucleare (Gilbertson e coll., 1983), la microvascolarizzazione (Bettini e coll., 1997) e la sub-graduazione dello stadio istologico (Galeotti et al., 1998). Scopo della presente nota è la presentazione di risultati preliminari sulla identificazione di micrometastasi linfonodali in cagne con tumore mammario maligno e linfonodo regionale negativo all'esame di routine, e sulla definizione del loro ruolo prognostico nell'arco di 1 e 2 anni post-mastectomia.

MATERIALI E METODI

Sono stati impiegati 101 casi di tumore mammario di cagna fissati in formalina ed inclusi in paraffina, scelti in quanto diagnosticati come maligni e di cui era disponibile il linfonodo regionale (inguinale superficiale o ascellare) come negativo per metastasi secondo l'esame istologico di routine. La diagnosi istologica è stata condotta secondo Marcato (1992) e lo stadio istologico secondo Gilbertson e coll. (1983). Da ogni caso sono state ottenute sezioni di 6 μ m, una del tumore mammario e due non seriate del linfonodo regionale, sottoposte a metodica immunohistochimica standard a tre passaggi: inibizione delle perossidasi endogene con metanolo, trattamento con forno a microonde in tampone citrato, siero primario anti-citocheratina 19 (Clone BA17) (Dako) diluito 1:50 e Kit-perossidasi (Società Prodotti Antibiotici). Per ogni sezione è stato previsto un controllo con omissione del siero primario. Dei casi risultati positivi per micrometastasi è stata accertata la sopravvivenza mediante contatto telefonico con i proprietari o con il veterinario referente.

RISULTATI

In tutti i tumori impiegati nell'indagine è stata riscontrata positività per la citocheratina 19. Essa si manifestava con la colorazione marrone del citoplasma delle sole cellule carcinomatose e/o dell'epitelio di lesioni displastiche associate, ma non delle cellule mioepiteliali e/o connettivali presenti nella sezione. Le micrometastasi linfonodali si sono rilevate prevalentemente nel seno sottocapsulare, nello spessore della capsula e più raramente nel tessuto linfoide corticale. Le micrometastasi linfonodali apparivano come singole cellule o aggregati di 4-5, con citoplasma immunocolorato in marrone, come le cellule carcinomatose del tumore primario.

In tabella 1 sono riportate le diagnosi e lo stadio istologico dei 101 casi utilizzati, e il numero e la percentuale, sul totale e per stadio, dei casi positivi per micrometastasi al linfonodo regionale. Come si evince dalla tabella la metodica immunohistochimica applicata ai linfonodi ha fatto rilevare micrometastasi in 23 casi su 101 (22,77%). In particolare: in 1 caso dei 23 (4,3%)

tumori a stadio 0, in 18 casi dei 71 (25,35%) tumori a stadio I e in 4 casi dei 7 (57,14%) a stadio II. Il confronto delle percentuali rilevate, condotto col Metodo Esatto di Fisher, ha fatto registrare una percentuale significativamente più alta nello stadio istologico I comparato a quello 0 ($P=0,03$), più alta ma non statisticamente significativa nello stadio II comparato a quello 0 ($P=0,058$) e nello stadio II confrontato a quello I ($P=0,093$).

In tabella 2 sono specificati, sui 4 linfonodi regionali delle ghiandole mammarie, dati di statistica descrittiva sulla numerosità totale e sulla percentuale di micrometastasi. Il confronto delle percentuali di positività per micrometastasi, condotto con il Metodo Esatto di Fisher, non ha fatto rilevare differenze sia tra la percentuale di positività destra vs sinistra nello stesso gruppo linfonodale ($P=0,26$ linfonodo inguinale superficiale destro vs sinistro; $P=0,52$ linfonodo ascellare destro vs sinistro) sia nel confronto tra percentuale di micrometastasi registrate agli inguinali superficiali, rispetto a quella registrata negli ascellari ($P=0,54$). Poiché con il test impiegato non si è rilevata una differenza statisticamente significativa nella percentuale di positività tra linfonodo inguinale destro e sinistro, il dato 24,41% (percentuale di coinvolgimento del linfonodo inguinale superficiale destro e sinistro) si può considerare indicativo per entrambi i lati. La stessa considerazione non è attualmente applicabile anche al gruppo degli ascellari, stante l'esiguità dei casi totali e soprattutto di quelli positivi per micrometastasi.

Dei 23 soggetti positivi per micrometastasi è stata accertata la sopravvivenza ad 1 anno per 18 soggetti (di 2 non è stato possibile reperire dati e 3 non hanno ancora finito il periodo di osservazione dei 12 mesi), e a 2 anni per 6 soggetti (2 sono morti per metastasi polmonari da tumore mammario rispettivamente a 18 e a 19 mesi, 13 devono ancora completare il periodo di osservazione di 24 mesi, mentre per 2 non è stato possibile reperire dati).

DISCUSSIONE

Dall'esame della casistica utilizzata si evince che in caso di tumore maligno e di linfonodo negativo per metastasi all'esame istologico routinario, la maggior parte dei tumori sono graduabili come a stadio 0 o I. Ciò verosimilmente poiché in casi a stadio II, che per definizione ha emboli nei vasi e/o interessamento del linfonodo regionale (Gilbertson e coll., 1983), l'interessamento linfonodale come metastasi è facilmente individuato. Le percentuali di micrometastasi si sono rivelate progressivamente crescenti progredendo dallo stadio 0 a quello II. Circa quest'ultimo stadio, stante la bassa numerosità di casi ottenuti, il dato è poco commentabile, anche perché la gravità del processo neoplastico è già documentata dalla presenza di emboli endovasali, pur in assenza di dimostrabile interessamento linfonodale. E' noto infatti che in seguito ad inoculazione di cellule neoplastiche nel territorio tributario, il linfonodo regionale funge più da barriera funzionale

che anatomica, e circa il 60% delle cellule inoculate possono semplicemente attraversarlo e guadagnare altre stazioni (Gilson, 1995). Il dato è, a nostro avviso, più interessante circa i tumori a stadio istologico I. Indipendentemente dal fatto di essere più numerosi, forse poiché sono tumori a più grave momento clinico, verso i quali il chirurgo esegue mastectomie radicali ed invia così anche il linfonodo regionale, essi mostrano percentuali di micrometastasi alte, se si considera che, in base ai casi esaminati, 1 tumore su 4 a stadio istologico I può avere micrometastasi. I casi, da noi riesaminati anche dopo il risultato immunohistochimico positivo per micrometastasi, non ci hanno fatto comunque rilevare obiettive indicazioni di invasione vasale nel tumore o alla sua periferia. Il dato che deriva dall'applicazione di metodiche immunohistochimiche anti-citocheratine sul linfonodo regionale, risulta così interessante in quanto permette di stadiare il soggetto con maggiore precisione. Infatti tali soggetti a stadio I, nel momento in cui le micrometastasi vengono rilevate, andrebbero inseriti nel gruppo a stadio II, o comunque separati da quelli a stadio I rimasti linfonodo-negativi.

Sui tumori mammari della cagna esiste già una segnalazione circa l'impiego di anticorpi anti-citocheratine per individuare la presenza di micrometastasi linfonodali (Bush e Rudolph, 1995). In quello studio si rilevò, su 77 casi, una percentuale di positività per micrometastasi pari al 68,8%. La percentuale di positività sul totale (21,8%) da noi ottenuta si avvicina molto ai valori registrati in diversi studi sulla donna (range 9-33%, Dowlatsahi, 1997), mentre è molto diversa da quella ottenuta da Bush e Rudolph. Ciò potrebbe essere imputato alla differente composizione della casistica di partenza in termini di stadio istologico. Infatti maggiore è la frazione di stadi II (che esprimono le più alte percentuali di micrometastasi) più alta può risultare la percentuale media del gruppo.

Il rilevamento di una maggiore rappresentatività dei linfonodi inguinali rispetto agli ascellari trova giustificazione nella maggiore frequenza di neoplasie nelle mammelle inguinali rispetto alle toraciche (Else e Hannant, 1979), ma anche nel fatto che la mastectomia radicale delle mammelle toraciche è più indaginosa rispetto a quella inguinale, ed il chirurgo non asporta il linfonodo ascellare se non palesemente interessato. Sono infatti molti i casi di mammelle toraciche scartati, poiché il linfonodo non era disponibile. In base ai risultati ottenuti sulle micrometastasi in relazione allo stadio, la mancata asportazione del linfonodo ascellare può comportare un rischio crescente, nei tre stadi istologici, di lasciare *in situ* linfonodi con micrometastasi. Considerazione che va vista in funzione del significato prognostico attribuibile alle micrometastasi in medicina veterinaria.

Il significato prognostico delle metastasi al linfonodo regionale in corso di carcinoma della mammella nella cagna è ormai assodato, nel senso di una sopravvivenza significativamente più bassa, rispetto ai soggetti linfonodo-negativi (Parodi, 1983). Invece nello studio di Bush e Rudolph

(1995) il significato della presenza di micrometastasi linfonodali nella cagna in corso di carcinoma della mammella non è stato affrontato in termini di prognosi. Il significato prognostico attribuito alle micrometastasi al linfonodo ascellare nella donna, ha subito nel corso degli anni un profondo cambiamento. Infatti prime indagini che non riuscirono a differenziare la sopravvivenza di soggetti positivi per micrometastasi rispetto a quelli linfonodo-negativi, sono state superate da indagini dell'ultimo decennio che hanno dimostrato non solo una sopravvivenza, ma anche un intervallo libero da cancro, più bassi per lo stesso tipo di confronto. I risultati ottenuti si sono modificati nel tempo per i seguenti motivi: l'introduzione di tecniche nuove per evidenziare le micrometastasi, l'aumento della entità numerica dei casi e l'aumento del tempo di follow up (Dowlatshahi, 1997). Le prime indagini con follow up di 5 anni nella donna sono state oggi rivalutate con tempi non inferiori a 10 anni (Dowlatshahi, 1997). E' rimasta invece invariata nel tempo l'opinione che la presenza di micrometastasi rappresenti una condizione prognosticamente più vantaggiosa della metastasi.

I risultati sul significato prognostico ottenuti con la presente indagine, seppure non conclusivi, si possono prestare alle seguenti considerazioni. La positività per micrometastasi sicuramente non influenza la sopravvivenza ad un anno, così come non risultava influenzata la sopravvivenza nella donna a 5 anni. Tuttavia, sebbene la numerosità per le conclusioni a due anni sia ancora bassa, i 2 casi morti per causa imputabile al tumore mammario prima dello scadere dei due anni, possono essere visti come una indicazione che la presenza di micrometastasi, se pone problemi di sopravvivenza, li influenza tardivamente rispetto alla mastectomia. Anche quest'ultima considerazione si pone in analogia a quanto registrato nella donna, in cui l'influenza sulla sopravvivenza si evince solo con follow up di lunga durata.

BIBLIOGRAFIA

1. Benazzi C., Preziosi R., Sarli G., Galeotti M., Marcato P.S.: Observations on the correlation between histological grading and survival times of canine and feline malignant mammary tumours. *Biomedical Research*, 10, 25-34, 1999.
2. Bettini G., Sarli G., Mandrioli L., Poemi M.G., Marcato P.S.: Prognostic value of intratumoral microvessel density in canine and feline mammary neoplasms. *Atti 15th Meeting ESVP*, 38, 1997.
3. Bush U., Rudolph R.: Mammakarzinom der hündin: eine neue routinediagnostik zum nachweis okkultes mikrometastasen in der regionären lymphknoten. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 108, 43-46, 1995.
4. Dowlatshahi K., Fan M., Snider H.C., Habib F.A.: Lymph node micrometastases from breast carcinoma. Reviewing the dilemma. *Cancer*, 80, 1188-1197, 1997.
5. Galeotti M., Benazzi C., Sarli G., Montagnese M., Marcato P.S.: Parametri istologici di prognosi nei tumori mammari maligni del cane. *Atti 4th European FECAVA-SCIVAC Congress*, 510, 1998
6. Gilbertson S.R., Kurzman D., Zachau R.E., Hurvitz A.I., Black M.M.: Canine mammary epithelial neoplasm: biological implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*, 20, 127-142, 1983.
7. Gilson S.D.: Clinical management of the regional lymph node. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 25, 149-167, 1995.
8. Else R.W., Hannant D.: Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Veterinary Record*, 104, 296-304, 1979.

9. Marcato P.S.: Patologia mammaria animale. Edagricole. Bologna, 1992.
 10. Parodi A.L.: Les éléments du pronostic des cancers mammaires de la chienne. Prat. Méd. Et Chir. Anim. Comp. 18, 31-36, 1983.
 11. Sapir O., Amromin G.D.: Obscure axillary lymph node metastases in carcinoma of the breast. Cancer, 1, 238-241, 1948.

Tipo istologico	Totale (*)	Stadio 0 (*)	Stadio I (*)	Stadio II (*)
Adenocarcinoma tubulare	28 (3)	8	16 (2)	4 (1)
Tumore misto maligno	34 (10)	10	24 (10)	--
Carcinoma papillare	30 (9)	5 (1)	22 (5)	3 (3)
Carcinoma solido§	9 (1)	--	9 (1)	--
<i>totale</i>	101 (23)	23 (1)	71 (18)	7 (4)
<i>percentuale micrometastasi</i>	22,77%	4,35%	25,35%	57,14%

(*) casi positivi per micrometastasi;

§ inclusi 4 casi di carcinoma solido a cellule fusate

Tabella 1. Diagnosi e stadio istologico dei casi utilizzati, numero e percentuale, sul totale e per stadio, dei casi positivi per micrometastasi al linfonodo regionale.

	Linfonodo		Micrometastasi		% Dx + Sx
	N°	% sul totale	N°	% di gruppo	
Inguinale destro	42	41,58	12	28,57	inguinali 24,41
Inguinale sinistro	44	43,56	9	20,45	
Ascellare destro	10	9,9	2	20,00	ascellari 13,33
Ascellare sinistro	5	4,95	--	--	

Tabella 2. Dati di statistica descrittiva sui linfonodi regionali utilizzati e su quelli positivi per micrometastasi.