

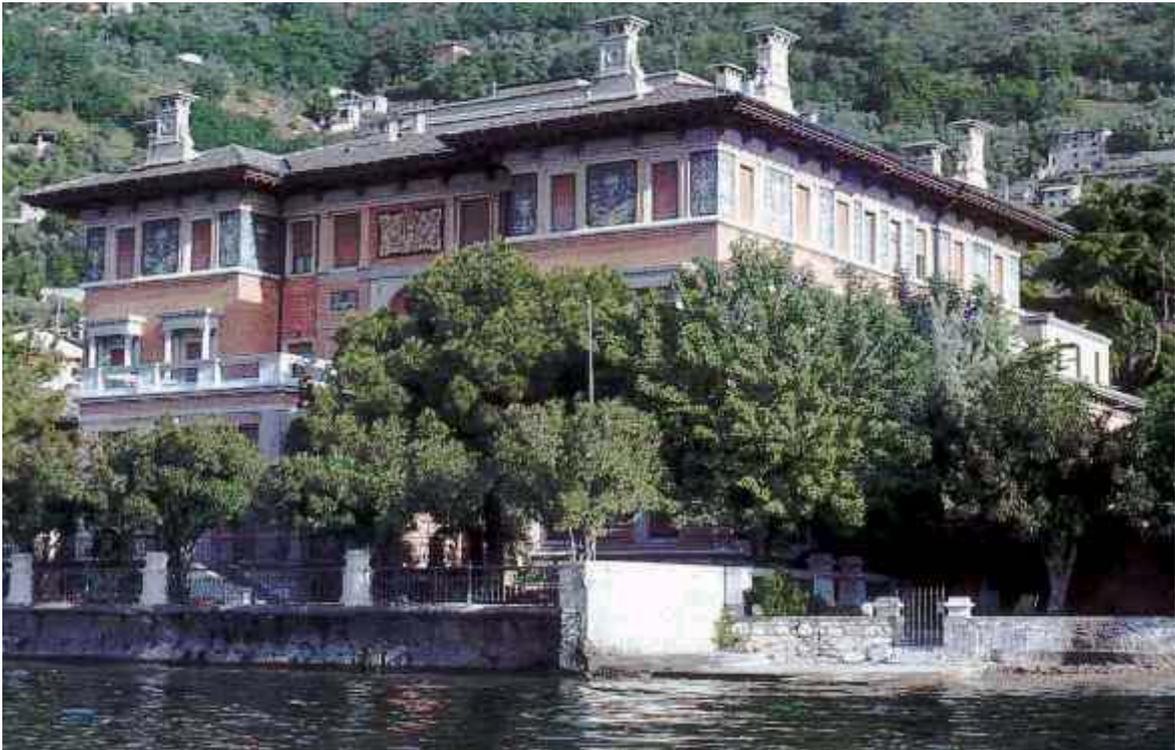
A.I.P. Vet.

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

AIPVet

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

I Congresso Nazionale



con la partecipazione

della Società Italiana di Patologia Tossicologica e Sperimentale

del Gruppo di Patologia Clinica Veterinaria

del Gruppo Veterinario di Analisi di Immagine

**Palazzo Feltrinelli, Gargnano (BS),
30 Aprile - 1 Maggio 2004**

**UN INFREQUENTE CASO DI "SPINDLE CELL TUMOR" A LOCALIZZAZIONE
SPLENICA PRIMARIA IN UN CANE. RILIEVI CITOLOGICI ED
ISTOPATOLOGICI, OSSERVAZIONI ISTOCHEMICHE ED
IMMUNOISTOCHEMICHE**

Antuofermo Elisabetta, Pirino Salvatore, Rocca Stefano, Antonica Mura, Anfossi Antonio,
Zucca Rosalba, Nieddu Antonio Mario*

Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica Veterinaria, Facoltà di
Medicina Veterinaria – *Istituto di Anatomia e Istologia Patologica, Facoltà di Medicina –
Università degli Studi di Sassari

Riassunto

Tutti i tumori fusocellulari derivano verosimilmente da una unica cellula staminale mesenchimale pluripotente. Macroscopicamente e microscopicamente i tumori delle cellule muscolari lisce e i tumori del tessuto connettivo fibroso, si presentano morfologicamente simili. Un tempo la diagnosi di fibrosarcoma veniva espressa più frequentemente; attualmente l'ausilio di tecniche sempre più sofisticate ci consente di differenziare con maggior precisione i differenti istotipi cellulari. Per tale motivo, abbiamo ritenuto interessante riferire su un cane meticcio, maschio, di quattro anni sottoposto ad eutanasia dopo aver mostrato letargia, anoressia e perdita di peso. Alla necropsia si osservava una voluminosa neoformazione splenica di colore biancastro, dura e di consistenza fibrosa. Il fegato si presentava notevolmente aumentato di volume con numerose neoformazioni di piccole e medie dimensioni. Diversi campioni appartenenti agli organi sopramenzionati, venivano sottoposti ad una prima osservazione citologica. Parte di questi, dopo fissazione in formalina venivano inclusi in paraffina. Sezioni di 3-5 μ erano sottoposte a colorazioni ordinarie e speciali (H. E., tricromica di Mallory Azan e Van Gieson). Si eseguivano prove immunoistochimiche utilizzando il seguente algoritmo anticorpale: anti pan-citocheratine, anti vimentina, anti fattore VIII, anti- α actina L, anti desmina, anti CD 15, anti S-100. Con il complesso delle tecniche diagnostiche utilizzate risultava possibile osservare l'aspetto citomorfologico il quadro istologico complessivo della neoformazione, e definire infine la caratterizzazione dell'istotipo cellulare. La neoplasia, altamente infiltrante, era costituita da ampi fasci intrecciati di cellule allungate

fusiformi, fibroblastosimili, a moderato indice mitotico, disposte in maniera ordinata, a spina di pesce. Esse risultavano positive alla vimentina e alla α actina L e negative alla desmina. Dette caratteristiche ci consentivano di formulare diagnosi di fibrosarcoma, neoplasia a infrequente localizzazione splenica primaria, e di identificare come metastasi della stessa, le neoformazioni riscontrate a livello epatico.

Parole Chiave: Tumore a Cellule Fusate, Milza, metastasi

Summary

A citologic, istopathologic, histochemical and immunoistochemical study on spindle cell tumor in a dog with primary localization in the spleen: an infrequent case. All the spindle cell tumors, derive from a unique pluripotent mesenchymal stem cell.

In this study we made a necropsia on a dog, male, four years old, that was submitted at eutanasia after a time of anorexia, lethargy and weight loss. At the gross morphology the dog presented, a voluminous white greenish, firm mass within the spleen and numerous multifocal mass of different size within the liver.

Numerous samples of spleen, liver and lymph node were employed for cytologic and histopathologic investigations.

Immunohistochemistry was performed, with antibody against pan-cytokeratin, vimentin, factor VIII, α actin-L, desmin, CD 15, S-100. Cytologic findings showed the typical aspect of sarcomatous cells. At the histopathological examination, the neoplasia appeared as an infiltrative tumor with interwoven/herringbone fascicular pattern. The histochemical reaction

showed positivity for collagen. The immunohistochemistry gave positive reaction to the anti-vimentin and the alfa actin antibody and no reaction for the anti-desmine antibody.

On these all findings, a final diagnosis of fibrosarcoma was achieved.

Key Words: Spindle Cell Tumor, Spleen, metastasis

Introduzione

Tutti i tumori fusocellulari derivano verosimilmente da una unica cellula staminale mesenchimale pluripotente. Appartengono alla categoria spindle cell tumors un gruppo eterogeneo di neoplasie, composte da cellule mesenchimali, capaci di produrre matrice collagena. Molte di queste, come lo schwannoma maligno, il leiomioma, l'istiocitoma fibroso maligno, il melanoma a cellule fusate e le corrispondenti forme non neoplastiche presentano caratteristiche istologiche simili ai tumori del tessuto connettivo fibroso. Per questa ragione in passato veniva emessa con frequenza la diagnosi di fibrosarcoma

Neoplasia relativamente comune nel gatto, infrequente nel cane, e nelle altre specie animali, il fibrosarcoma si sviluppa prevalentemente in soggetti adulti o anziani. L'età media dei soggetti colpiti è infatti di 12 anni nel gatto e 10 nel cane. In quest'ultima specie inoltre, la neoplasia sembra interessare maggiormente le femmine. Non sono segnalate predisposizioni di razza. Le sedi di più frequente localizzazione risultano nell'ordine: cute, sottocute, estremità degli arti, cavità orale e nasale. Rara è la localizzazione a carico degli organi interni.

Per quanto detto, abbiamo ritenuto interessante descrivere un caso di fibrosarcoma a localizzazione splenica primaria osservato in un cane di giovane età. Di tale neoplasia abbiamo preso in considerazione l'aspetto citomorfologico, il quadro istologico complessivo, e l'istotipo cellulare coinvolto.

Materiali e metodi

Namu, era un cane, meticcio maschio, di quattro anni di età, che veniva sottoposto ad laparotomia esplorativa, dopo aver mostrato per un lungo periodo di tempo letargia, anoressia e perdita di

peso. In conseguenza dell'evidenziazione di voluminose masse neoplastiche in cavità addominale, veniva soppresso mediante eutanasia e condotto presso l'Istituto di Patologia Generale ed Anatomia Patologica della Facoltà di Veterinaria di Sassari, per la necropsia. Diversi campioni appartenenti agli organi coinvolti dalla neoplasia, venivano sottoposti ad una prima osservazione citologica. Parte di questi, compresi i linfonodi portali, meseraici, pancreatici e mediastinici dopo fissazione in formalina venivano inclusi in paraffina. Sezioni di 3-5 µ venivano poi colorate con metodiche generali e speciali (H. E., tricromica di Mallory Azan. Policrom, e Van Gieson). Altri campioni erano sottoposti a processazione immunohistochimica, mediante la tecnica di immunoperossidasi. Gli anticorpi utilizzati, le loro diluizioni e gli eventuali metodi di smascheramento vengono riportati nella tabella 1.

Risultati

Alla necropsia si osservava la presenza di una neoformazione splenica, di circa 10x10 cm, singola, di colore grigio-biancastro, di consistenza duro-fibrosa e priva di capsula. Al taglio si presentava lobulata, opaca, con numerose aree emorragiche di colore rosso-scuro e aree bruno-giallastre di aspetto necrotico (Fig 1). A causa della presenza della massa neoplastica il parenchima splenico risultava nettamente atrofizzato. Il fegato appariva notevolmente aumentato di volume con numerose neoformazioni di dimensioni variabili da una nocciola fino ad un mandarino (Fig 2). Tali lesioni risultavano del tutto sovrapponibili per aspetto e consistenza a quelle della milza. I linfonodi portali, meseraici, pancreatici e mediastinici non mostravano variazioni di aspetto e di volume. All'esame citologico del tessuto splenico ed epatico si osservava la presenza di scarsi elementi stromali differenziati, per lo più singoli, raramente riuniti in piccoli gruppi di due o tre cellule al massimo. Queste, di forma prevalentemente fusata e di circa 12 micron di diametro, presentavano margini cellulari poco definiti, abbondante citoplasma basofilo, nuclei ovalari e allungati con uno o due nucleoli ben evidenti in posizione centrale (Fig 3). Nel complesso si rilevava moderata anisocitosi e anisocariosi. Raro era il

riscontro di mitosi. All'esame istologico la neoplasia, caratterizzata da elevata cellularità, appariva scarsamente demarcata e incapsulata e a crescita espansiva. Le cellule risultavano allungate, fusiformi, fibroblastosimili, altamente stipate tra loro, disposte in ampi fasci, intrecciati in maniera ordinata, frequentemente disposti a spina di pesce (Fig 4). I limiti cellulari erano mal definiti, il citoplasma eosinofilo e di aspetto fibrillare. I nuclei risultavano irregolari, di aspetto fusato o stellato, con uno o due nucleoli molto ben evidenti in posizione centrale. Nel complesso il pleomorfismo cellulare e nucleare risultava moderato e le mitosi non superavano le 2-3 per HPF. Si osservava inoltre nello spessore della massa la presenza di aree multifocali di necrosi emorragiche e di scarsi infiltrati linfoplasmacellulari.

Con l'ausilio di colorazioni speciali, quali la tricromica di Azan Mallory, la Policrom, e la Van Gieson, si evidenziava la presenza di proteine fibrose collagene.

Le prove immunoistochimiche attestavano una positività citoplasmatica diffusa ed intensa alla vimentina (Fig 5). In limitate aree della neoplasia era inoltre osservabile positività alla α actina-L. Detta positività appariva prevalentemente in corrispondenza delle trabecole spleniche o a carico di poche cellule sparse nel parenchima. Inoltre l'impiego dell'anticorpo Ki-67 svelava una

intensa attività preparatoria alle mitosi. L'insieme delle indagini espletate ha consentito di identificare la neoplasia come fibrosarcoma splenico primario con metastasi al fegato e senza coinvolgimento linfonodale

Considerazioni conclusive

Come risulta da precedenti lavori i fibrosarcomi splenici primari rappresentano il 12% dei sarcomi di origine non angiomatosa e non linfomatosa, e si manifestano in cani la cui età media è intorno ai dieci anni.

Il fibrosarcoma è un tumore che tende a recidivare dopo asportazione chirurgica, in misura proporzionale al grado di malignità. La possibilità di dare metastasi al contrario non è frequente, e le percentuali riportate in bibliografia variano dal 9% al 25%.

La più frequente via di metastatizzazione è senza dubbio quella ematica, ed il polmone risulta essere l'organo più colpito da metastasi a distanza.

È interessante rilevare che nell'uomo, come nel cane, il fibrosarcoma rappresenta il 12% dei tessuti molli, colpisce prevalentemente gli individui di sesso maschile tra i 30 e 55 anni, sebbene sia possibile osservarlo in bambini di età inferiore ad un anno (fibrosarcoma infantile). Le metastasi linfonodali risultano infine nello 0,8% dei casi.

Anticorpo	Specificità	Clone	Smascheramento	Fonte	Diluizione
PAN-CK	Proteine del citoscheletro	Monoclonale	pepsina	Sigma	1:300
VIMENTINA	endoteli, fibroblasti c. mesenchimali	Monoclonale		Sigma	1:200
α ACTINA-L	m liscio mioepitelio miofibroblasti	Monoclonale		Sigma	1:400
MIOSINA	actin binding protein	Monoclonale		Dako	1:100
DESMINA	muscolare liscio e striato	Monoclonale	proteasi	Dako	1:600
MYO-D1	muscolare striato	Monoclonale	citrato	Dako	1:50
MIOGENINA	muscolare striato	Monoclonale	citrato	Dako	1:50
S-100	snc, c. schwann, melanociti	Policlonale		Dako	1:3500
FAT VIII	endoteli	Policlonale	proteasi	Dako	1:600
CD 34	endoteli	Monoclonale		Dako	1:50
CD 35	dendritici cell sarcoma	Monoclonale	proteasi	Dako	1:20
CD 10	neoplasie stromali	Monoclonale	citrato	Dako	1:50
CD 99	mark. linforeticolare	Monoclonale		Dako	1:100
CD 21	c. dendritiche follicolari	Monoclonale	proteasi	Dako	1:60
CD 117	GIST	Monoclonale		Dako	1:50
MIB-1	Indice mitotico	Monoclonale	citrato	Dako	Prediluito

Tabella 1: Algoritmo anticorpale utilizzato e, rispettive diluizioni.



Figura 1: (Milza). Aree emorragiche di colore rosso-scuro e aree bruno-giallastre di aspetto necrotico.

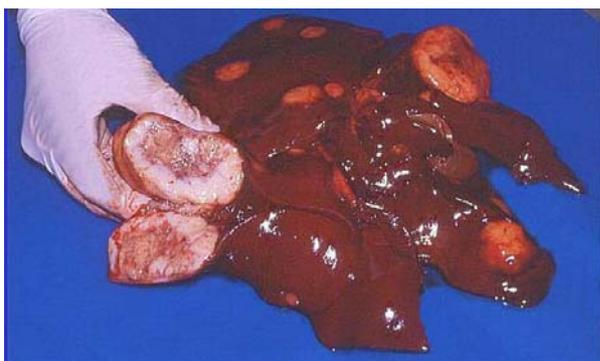


Figura 2: (Fegato). Multifocali neoformazioni di dimensioni variabili.

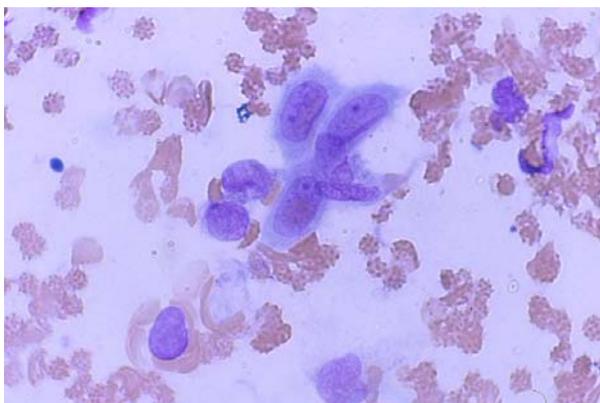


Figura 3: (Milza M.G.G.). Cellule fusate riunite in gruppo, nuclei grandi e ovalari, nucleoli evidenti.

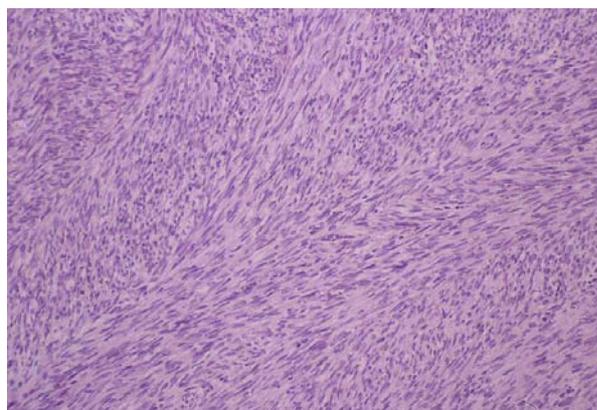


Figura 4: (Milza E.E). Fibroblasti disposti in ampi fasci a spina di pesce.

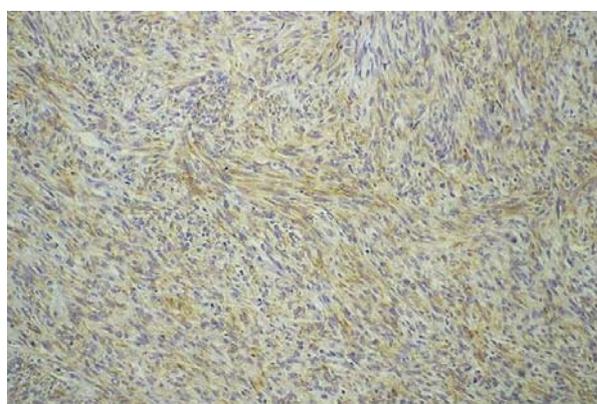


Figura 5: (Milza IHC). Diffusa positività alla vimentina.

Anche queste considerazioni rafforzano l'utilità di segnalare un caso di fibrosarcoma come quello da noi osservato. La diagnosi pienamente attendibile, è stata possibile grazie alle accurate osservazioni citologiche ed istologiche, ed ulteriormente confermata dagli accertamenti immunohistochimici. Infatti la chiara e diffusa positività alla vimentina confermerebbe quanto già ampiamente documentato da altri autori, circa l'origine fibroblastica della neoplasia, così come la focale positività alla alfa-actina potrebbe essere interpretata come una possibile differenziazione della linea mioide e/o miofibroblastica. La reazione negativa alla desmina, invece, al MYO-D1 e alla miogenina, escluderebbe l'origine miogena delle cellule proliferanti, indicando una possibile compartecipazione della linea miofibroblastica nello sviluppo della neoplasia. Infatti in base alle nostre esperienze non possiamo escludere che le cellule positive alla α actina-L

siano per l'appunto miofibroblasti. Resta comunque indubbio che nelle neoplasie del cane di origine sarcomatosa la distinzione tra fibroblasti, mioblasti e cellule staminali primitive è praticamente impossibile anche dopo studi di immunoistochimici ed ultrastrutturali; ognuna di queste cellule, infatti, può presentare una o più componenti di differenziazione mioide.

Bibliografia

1. Weinstein M.J., Carpenter J.L., Schunk C. J.M (1989). "Non angiogenic and non lymphomatous sarcomas of the canine spleen: 57cases (1975-1987). JAM Vet Med Ass, 195: 784-788
2. Oakes M.G., Lewis D.D., Hedlund C.S. e Hosgood G. (1993). Canine oral neoplasia Compendium on continuing Education for the Veterinarian 15: 15-30.
3. Slinger W.L., Culbertson M.R. e Kass P.H. (1994). "Primary Mesenchymal non angiomatous and non lymphomatous neoplasm in the canine spleen: anatomic classification, immunohistochemistry and mitotic activity correlated with patient survival". Vet Path 31-47
4. A.Poli., F. Abramo., S., Sozzi. I tumori dei tessuti molli negli animali domestici pg 40-42. Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche-Brescia luglio 1997.
5. Marcato P.S.(2002). Neoplasie della pelle. 1.28.6. Tumori del tessuto connettivo fibroso.
6. M.J. Hendrick., E.A. Mahaffey., F.M. Moore., J.H. Vos., E. J.Walder.Histological Classification of Mesenchymal Tumors of Skin and Soft Tissue of domestic animal. WHO second series volume 2
7. M.H Goldschmidt and M.J.Hendrick. Tumors of Skin and soft Tissues. Donald J. Meuten,Editor. Tumors in domestic Animals fourth edition.
8. Rosai and Ackerman's. Surgical Pathology ninth edition (2004). Soft Tissue volume 2