

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

- Ciclo XXVII -

Settore Concorsuale di Afferenza: 07/H2

Settore Scientifico Disciplinare: VET/03

Diagnosi e terapia dei tumori delle cavità nasali del cane

Presentata da:

Dott.ssa Simona Cancedda

Coordinatore del Dottorato

Prof. Carlo Tamanini

Relatore

Prof. Giuliano Bettini

Correlatore

Dott.ssa Silvia Sabattini

Esame finale anno 2015

Indice

Parte Generale

Capitolo 1 I tumori nasali nel cane

1.1	Introduzione	1
1.2	Comportamento biologico.....	1
1.3	Presentazione clinica	3
1.4	Diagnosi e stadiazione	5
1.5	Fattori di prognosi	12
	Bibliografia	15

Capitolo 2 Esame istopatologico dei tumori delle cavità nasali

2.1	Classificazione istologica dei tumori nasali.....	19
2.2	Tumori nasali di origine epiteliale	19
2.3	Tumori nasali di origine mesenchimale.....	22
2.4	Altri tumori nasali	23
2.5	Marker immunohistochimici di utilità prognostica nelle neoplasie nasali ..	24
	Bibliografia	37

Capitolo 3 Terapia dei tumori nasali

3.1	Introduzione	50
3.2	Chirurgia	51
3.3	Radioterapia	52
3.4	Chemioterapia	63
3.5	Altre terapie	65
	Bibliografia	68

Parte Sperimentale

Capitolo 4 Indagine retrospettiva

4.1	Introduzione	73
4.2	Materiali e Metodi	73
4.3	Risultati	73
4.4	Discussione	77
	Bibliografia	78

Capitolo 5 Indagine prospettica

5.1 Introduzione	79
5.2 Materiali e Metodi	80
5.3 Risultati	85
5.4 Discussione	94
Bibliografia	100

Capitolo 6 Indagine immunostochimica

6.1 Introduzione	103
6.2 Materiali e Metodi	103
6.3 Risultati	106
6.4 Discussione	106
Bibliografia	112

Parte generale

Capitolo 1

I tumori nasali nel cane

1.1 Introduzione

I tumori delle cavità nasali e dei seni frontali nella specie canina sono relativamente infrequenti, con un'incidenza dell'1-2.5% sulla totalità delle affezioni neoplastiche diagnosticabili in questa specie [Patnaik *et al*, 1989]. Circa l'80% di questi tumori è maligno e il 60-75% è di origine epiteliale [Legendre *et al*, 1983; Patnaik *et al*, 1989]. Nel cane, l'adenocarcinoma (ACA) è l'istotipo più frequente, seguito dal carcinoma squamocellulare (SCC), carcinoma a cellule di transizione (TCC) e carcinoma indifferenziato [MacEwen *et al*, 1977; Patnaik *et al*, 1989]. Osteosarcoma, condrosarcoma e fibrosarcoma sono i tumori mesenchimali più diffusi [Patnaik *et al*, 1989; MacEwen *et al*, 1977]. Raramente vengono diagnosticate altre tipologie neoplastiche quali tumori rotondocellulari (linfoma, tumore venereo trasmissibile e mastocitoma) o melonoma [Patnaik *et al*, 1989; Ginel *et al*, 1995; Kaldrymidou *et al*, 2000; Naganobu *et al*, 2000].

1.2 Comportamento biologico

I tumori nasali si sviluppano principalmente in cani di età compresa tra 8.7 e 10.7 anni; le razze dolicocefale di taglia medio-grande e i soggetti di sesso maschile sembrano predisposti all'insorgenza di questo genere di neoplasie [Patnaik *et al*, 1989; Hayes *et al*, 1982]. Le razze dolicocefale risultano maggiormente a rischio a causa della conformazione delle vie aeree nasali, più lunghe e articolate rispetto a quelle dei brachicefali. La maggiore complessità della regione dei turbinati nasali di queste razze comporta, infatti, un aumento della turbolenza dell'aria e una maggiore superficie esposta alla deposizione delle particelle inalate [Wilson, Dungworth, 2002; Hayes *et al*, 1982]. Diversi studi epidemiologici, infatti, supportano l'evidenza di un ruolo eziopatogenetico

svolto dalle polveri ambientali e dal fumo di tabacco [Bukowski *et al*, 1998; Reif *et al*, 1998]. È stato suggerito, infatti, che l'esposizione cronica ad inquinanti ambientali quali fumo passivo di sigaretta, polvere di legno e/o tossine provenienti da impianti industriali possa essere un possibile fattore predisponente nei cani che trascorrono gran parte del loro tempo in ambienti urbani [Bukowski *et al*, 1998; Reif *et al*, 1998].

Nello sviluppo delle neoplasie endonasali del cane è stato ipotizzato anche un possibile ruolo svolto dall'infiammazione cronica delle vie nasali, come ad esempio a seguito di infezione da *Aspergillus* spp o come risposta al trattamento delle stesse con clotrimazolo [Greci *et al*, 2009].

Numerosi studi sono stati condotti per rilevare possibili meccanismi molecolari associati alla genesi dei tumori endonasali. In uno studio, è stato riscontrato l'accumulo della proteina nucleare p53 in circa il 60% degli adenocarcinomi nasali del cane osservati, suggerendo che, la sovraespressione del suo inibitore potrebbe avere un ruolo nella genesi tumorale [Gamblin *et al*, 1997]. Diversi studi hanno riscontrato una up-regulation di enzimi, quali ciclossigenasi-2 (COX-2) e di fattori di crescita epiteliale e vasale (epidermal growth factor, EGF; vascular endothelial growth factor, VEGF) nei tumori endonasali, in particolare negli istotipi epiteliali. L'espressione della COX-2 appare correlata ad una maggiore aggressività del tumore, a soppressione dell'apoptosi cellulare, ad una più efficace angiogenesi e marcata stimolazione della riproduzione delle cellule neoplastiche [Borzacchiello *et al*, 2004; Kleiter *et al*, 2004; Belshaw *et al*, 2010]. EGF e VEGF sono due fattori di crescita ai quali è stato attribuito un importante ruolo nella carcinogenesi [Shiomitsu *et al*, 2009]. A questa parte viene dedicata ampia trattazione nel capitolo 2, a cui si rimanda.

I tumori nasali sono caratterizzati da elevata aggressività locale e metastatizzano a carico dei linfonodi regionali (retrofaringei mediali, mandibolari e cervicali superficiali) e/o a distanza (principalmente a livello polmonare) in tempi piuttosto lunghi durante il decorso della patologia [Patnaik *et al*, 1989; Henry *et al*, 1998; Northrup *et al*, 2001]. Nella maggior parte dei cani la causa di morte è, tuttavia, la progressione locale della neoplasia piuttosto che i secondarismi a distanza che raramente danno sintomi clinici importanti [Patnaik *et al*, 1989; Northrup *et al*, 2001]. Al momento della diagnosi, la percentuale di cani con malattia metastatica varia dallo 0% al 12.5%, per poi arrivare al 41- 45% dei soggetti

con carcinomi nasali in fase avanzata [Patnaik *et al*, 1989; Thèon *et al*, 1993]. Siti di metastasi meno comuni sono rappresentati da ossa, reni, fegato, pelle ed encefalo [Hahn *et al*, 1990; Hahn *et al*, 1997; Northrup *et al*, 2001].

1.3 Presentazione clinica

Le neoplasie nasali originano solitamente dalla porzione aborale delle cavità, in prossimità della lamina cribrosa dell'etmoide. Più raramente il loro sito di origine è rappresentato dal seno frontale. Di solito questi tumori hanno una crescita lenta e piuttosto infiltrante, frequentemente risultano monolaterali al momento della diagnosi, ma tendono a distruggere il setto nasale, con invasione della cavità controlaterale e delle strutture adiacenti (cavità retrobulbare, orale e intracranica). Queste caratteristiche portano ad un'insorgenza piuttosto subdola in quanto, nelle prime fasi dello sviluppo tumorale, il paziente non presenta evidenti sintomi clinici riconducibili alla patologia in corso con il risultato, in molti casi, di ritardare la diagnosi corretta. In media, la durata dei sintomi clinici prima di arrivare alla diagnosi di neoplasia nasale è di circa 3 mesi [MacEwen *et al*, 1977]. Il motivo per il quale alla comparsa dei primi segni clinici non fa seguito una diagnosi definitiva è che tali sintomi sono facilmente confusi con quelli di altre affezioni delle vie respiratorie superiori. Diagnosi differenziali includono riniti batteriche o fungine (*e.g.* aspergillosi), riniti idiopatiche, emorragie nasali, disordini della coagulazione a diversa eziologia, traumi, corpi estranei in cavità nasale, osteomieliti, ascessi periodontali e malattie parassitarie (*e.g.* ehrlichiosi e leishmaniosi) [Turek e Lana, 2007]. Da ricordare che, oltre alla neoplasia, non è raro riscontrare la presenza di una o più patologie concomitanti, principalmente di natura infettiva. Questo spiegherebbe il fatto che, in anamnesi, non di rado il proprietario riferisca di una remissione parziale della sintomatologia clinica in seguito a terapia sintomatica con antibiotici, antinfiammatori non steroidei o steroidi. Questo è dovuto principalmente ad una temporanea risoluzione delle infezioni batteriche secondarie e dell'infiammazione dei tessuti perilesionali.

In generale, in pazienti con neoplasie nasali i sintomi clinici più frequenti sono i seguenti [Madewell *et al*, 1976; Patnaik *et al*, 1989]:

- Secrezione nasale, unilaterale o bilaterale, di tipo sieroso, mucopurulento, o con striature ematiche, inizialmente monolaterale ma diventa bilaterale a seguito della progressione neoplastica
- Epistassi, emissione di sangue dal naso, che di solito è intermittente e progressiva, unilaterale o bilaterale
- Starnuti e/o reverse sneezing (starnuto inverso)
- Respirazione stertorosa fino a gravi difficoltà respiratorie (dispnea) nei casi di grave ostruzione del flusso d'aria in entrambe le narici
- Epifora (lacrimazione eccessiva) dovuta ad ostruzione meccanica del dotto nasolacrimale
- Esoftalmo, in seguito a coinvolgimento della cavità retrobulbare da parte della neoplasia
- Deformità facciale, dovuta a lisi delle ossa della cavità nasale e invasione del tessuto sottocutaneo
- Deformazione del palato duro
- Raramente si osservano segni neurologici dovuti all'invasione neoplastica, attraverso la lamina cribrosa dell'etmoide, della cavità cranica. Tra questi quelli di più comune riscontro sono cambiamenti nel carattere, deficit visivi e atassia, fino a segni più avanzati come crisi convulsive, cecità, stupore e stato comatoso
- Dolore alla palpazione della regione frontale o all'apertura della bocca
- Raramente presenza di fistolizzazioni

La sintomatologia clinica ha un carattere progressivo e diventa sempre più evidente man mano che aumenta l'invasione delle vie respiratorie superiori e delle strutture circostanti. Tali condizioni incidono gravemente sulla qualità di vita dell'animale e, nel caso in cui il tumore non venga trattato, il paziente viene sottoposto ad eutanasia nel giro di poco tempo. Nello studio condotto da Rassnick *et al* (2006) venivano considerati 139 cani con carcinoma nasale non sottoposti ad alcun trattamento. Il tempo di sopravvivenza mediano riportato per questi pazienti era di 95 giorni e la maggior parte di questi venivano sottoposti ad eutanasia per progressione locale della lesione [Rassnick *et al*, 2006].

1.4 Diagnosi e stadiazione

Una diagnosi presuntiva di neoplasia nasale si può formulare sulla base dei dati anamnestici, dei segni clinici e delle indagini diagnostiche per immagini effettuate ma, in ogni caso, essa deve essere supportata da una conferma istopatologica. Accertamenti quali esami ematici completi e test sierologici per le principali patologie infettive, volti ad escludere altre patologie, devono eseguirsi in prima istanza e in tempi brevi. In caso di scolo mucopurulento, è utile effettuare un tampone nasale con esame colturale ed antibiogramma, al fine di individuare in maniera precisa e tempestiva l'agente eziologico infettante e l'antibiotico mirato. Se il cane presenta una storia di epistassi spontanea di origine sconosciuta, sarà necessario effettuare anche un profilo coagulativo volto ad accertare eventuali disordini della coagulazione.

Fondamentali risultano gli esami diagnostici che consentono di valutare l'esatta estensione e localizzazione della neoplasia e di effettuare un prelievo mirato della lesione, utile per giungere ad una diagnosi istologica precisa.

Lo studio radiografico del cranio viene solitamente effettuato in pazienti con segni clinici riferibili a problematiche croniche a carico delle cavità nasali. Tale metodica può fornire informazioni importanti in caso di neoplasie in stadi avanzati, evidenziando alterazioni caratteristiche delle cavità nasali, quali aumento della densità all'interno di una o entrambe le cavità nasali e/o scomparsa della trama trabecolare con eventuale lisi dell'osso vomere e del setto nasale. Tali reperti si apprezzano principalmente nella proiezione ventro-dorsale a bocca aperta (*open-mouth view*) per la realizzazione della quale è necessario porre l'animale in anestesia generale. Meno ricca di informazioni è la proiezione latero-laterale, sicuramente parte integrante ma non fondamentale dello studio radiografico, che deve essere invece costantemente perfezionato con l'esecuzione della proiezione rostro-caudale per i seni frontali (*sky-line view*). In caso di neoplasia, questa proiezione rivela una densità omogenea del seno frontale omolaterale riferibile alla presenza di muco nel seno stesso, in quanto il drenaggio verso la cavità nasale è impedito dalla presenza del tessuto neoplastico. L'esame radiografico del torace è utile complemento dell'indagine, nonostante la già citata rarità delle metastasi a tale livello.

Anche in medicina veterinaria è sempre più diffuso il ricorso a tecniche diagnostiche per immagini avanzate quali esami tomografici computerizzati (TC) o

di risonanza magnetica (RM) che, per questo tipo di neoplasie, localizzate in aree complesse con sovrapposizioni di piani, sono di superiore valore diagnostico rispetto alla radiologia tradizionale [Thrall *et al*, 1989; Park *et al*, 1992; Saunders *et al*, 2003]. La possibilità di ottenere immagini trasversali, senza l'inconveniente della sovrapposizione di strutture, tipica della radiologia, permette di identificare con precisione entrambe le cavità nasali, la sede, la dimensione della lesione e di visualizzare i rapporti che esse contraggono con le strutture vicine, fondamentale ai fini di un'adeguata pianificazione terapeutica [Thrall *et al*, 1989; Park *et al*, 1992; Saunders *et al*, 2003]. In particolare, mediante esame TC è possibile valutare l'integrità della lamina cribrosa dell'etmoide e l'eventuale invasione della cavità intracranica da parte della lesione, riscontro importante ai fini di una valutazione prognostica. Altre caratteristiche riscontrabili di solito in caso di neoplasia nasale, quali lisi delle ossa limitrofe, invasione del tessuto sottocutaneo e/o retrobulbare sono valutabili in maniera precisa con questa metodica [Burk RL, 1992]. Inoltre, l'esame TC risulta un'indagine più accurata nel differenziare le lesioni neoplastiche dalle riniti micotiche, entrambe considerate patologie croniche delle cavità nasali [Saunders *et al*, 2003]. Mediante un unico studio tomografico, è possibile valutare la lesione primaria ed effettuare la ricerca di eventuali lesioni metastatiche. La somministrazione del mezzo di contrasto iodato consente di visualizzare in maniera accurata la componente vascolare della lesione, valutare i rapporti che questa contrae con le strutture adiacenti e permette di identificare lesioni altrimenti non distinguibili dai tessuti circostanti [Kuehn *et al*, 2006]. Infine, la TC risulta particolarmente utile ai fini di un'adeguata pianificazione computerizzata radioterapica (vedi oltre) e sempre più frequentemente anche in medicina veterinaria, viene utilizzata per valutare in maniera obiettiva la risposta ottenuta alle differenti terapie proposte e per monitorare tale risultato nel tempo (follow-up). Anche la RM è un'indagine diagnostica eseguita in presenza di neoplasie nasali, in particolare nel caso in cui l'animale presenti una sintomatologia neurologica (crisi epilettiche, ottundimento del sensorio, abbattimento) dovuta ad un'eventuale compressione cerebrale da parte della massa. Tale metodica consente di valutare al meglio l'entità della compressione cerebrale in caso di coinvolgimento della lamina cribrosa e invasione della cavità intracranica. In generale, la RM ha una risoluzione di contrasto maggiore per i tessuti molli, mentre

la TC ha una maggiore risoluzione spaziale ed è più accurata nell'evidenziare un eventuale coinvolgimento osseo. In alcuni studi, tali metodiche sono state messe a confronto con l'intento di individuare la più accurata per la diagnosi di neoplasia endonasale. In particolare, in un lavoro è emerso che la RM è preferibile per differenziare le aree a contenuto fluido da quelle costituite da tessuti solidi, mentre la TC è superiore nel mettere in evidenza la presenza di aree litiche a carico delle ossa prossime alla lesione; tuttavia, entrambe sono in grado di identificare anomalie a carico dei seni frontali [Drees *et al*, 2009]. In assenza di coinvolgimento della cavità intracranica, le due metodiche non si differenziano significativamente tra loro; pertanto, la TC è ad oggi considerata soddisfacente per lo studio delle neoplasie nasali e dei seni paranasali del cane [Drees *et al*, 2009].

Altro esame che permette di compiere un ulteriore passo verso la formulazione di una diagnosi definitiva è l'indagine endoscopica, la rinoscopia. Mediante utilizzo di endoscopi rigidi o flessibili è possibile individuare la neoplasia come una lesione occupante spazio all'interno di una o entrambe le cavità. Questa metodica consente di effettuare prelievi dalla lesione per esame citologico o biopsia della stessa per indagine istologica. Da ricordare, infatti, che l'evidenziazione della neoformazione con le metodiche in precedenza citate non può che supportare in via presuntiva la diagnosi di neoplasia delle cavità nasali. La diagnosi definitiva richiede la conferma cito-istopatologica della lesione.

L'esame citologico della lesione può essere eseguito mediante brushing o flushing delle cavità nasali. Il brushing, o "spazzolamento", consiste nell'inserimento all'interno delle cavità nasali di uno spazzolino citologico monouso. Questo viene fatto ruotare sulla mucosa in maniera tale che le cellule rimangano trattenute tra le setole e, successivamente, lo si può strisciare direttamente su un vetrino portaoggetti, oppure viene immerso in una provetta contenente soluzione fisiologica, successivamente posta a centrifugare al fine di ottenere una sospensione cellulare. Il materiale così ottenuto, viene strisciato su un vetrino portaoggetti e viene poi esaminato previa colorazione [Nelson, Couto, 2010]. Il flushing, o lavaggio nasale, viene eseguito posizionando l'animale in decubito sternale e con le narici rivolte verso il basso, inserendo un catetere nella regione caudale della cavità nasale e iniettando della soluzione fisiologica sterile. Il liquido che fuoriesce dalle narici esterne viene così raccolto ed esami-

nato citologicamente [Nelson, Couto, 2010]. Dai campioni prelevati per l'istologia è anche possibile effettuare valutazioni citologiche mediante apposizione o schiacciamento dei prelievi bioptici al fine di valutare la cellularità del pezzo ed eventualmente giungere ad una prima diagnosi presuntiva citologica. Le indagini citologiche sono in generale poco invasive, rapide e i risultati di solito disponibili per il clinico in tempi brevi. Il loro limite è rappresentato dal fatto che, in molti casi, il responso può non essere soddisfacente dal punto di vista diagnostico per la quota relativamente elevata di falsi negativi legati alla superficialità del prelievo e alla compresenza di infiammazione. La diagnosi definitiva non può pertanto prescindere da un esame istopatologico della lesione. Questo esame prevede il prelievo di materiale tumorale e successivo invio dello stesso a laboratori specializzati per l'inclusione e la successiva valutazione istopatologica. L'effettuazione di un prelievo bioptico richiede un'anestesia generale e di solito viene effettuato per via endoscopica o eseguito TC guidato. L'esame tomografico consente di individuare la parte più idonea al prelievo, optando per le zone che acquisiscono maggiore contrasto e quindi più vascolarizzate e attive. In questi casi è possibile effettuare il prelievo mediante ago Tru-Cut, ad oggi considerato il metodo più accurato, economico e semplice per campionare la neoplasia. Questo ago è costituito da uno stiletto caratterizzato da un incavo, avvolto esternamente da una cannula. Quando lo strumento è pronto per effettuare la biopsia, lo stiletto è completamente ricoperto dalla cannula e, di conseguenza, l'incavo non è visibile. Una volta individuata la sede da campionare, l'ago viene immobilizzato e lo stiletto viene fatto avanzare oltre la cannula, permettendo in tal modo all'incavo di riempirsi di tessuto. Quindi, mediante un pistone, la cannula viene a sua volta fatta scattare in avanti, trancianando in questo modo il campione e coprendo l'incavo dello stiletto. Questo movimento della cannula permette, inoltre, di evitare la fuoriuscita del campione dall'incavo quando l'ago viene rimosso. Tale campione viene subito immerso in formalina tamponata al 10% e spedito al laboratorio per l'esame istopatologico.

I tumori nasali sono caratterizzati da un tasso metastatico piuttosto basso (0-12% al momento della diagnosi) ma risulta di fondamentale importanza valutare la presenza di eventuali secondarismi poiché la loro presenza può condizionare l'approccio terapeutico e la prognosi. Di conseguenza lo studio TC può in-

cludere la valutazione del torace e dell'addome (studio TC total body) ottenendo in questo modo informazioni dettagliate e precise. In alternativa, per questi distretti è possibile effettuare uno studio radiografico del torace e un'ecografia addominale. Per completare la stadiazione è necessario effettuare un prelievo citologico (*fine needle aspiration*, FNA) dei linfonodi regionali, in particolare dei mandibolari di entrambi i lati ed eventualmente dei retrofaringei mediali, qualora aumentati di volume.

Per le neoplasie nasali, nel corso degli anni sono stati proposti diversi sistemi di stadiazione (**Tabella 1.1**). Il primo, proposto nel 1980 dalla World Health Organization (WHO), è basato sul sistema TNM che valuta il tumore primario (T), i linfonodi regionali (N) e la presenza\assenza di metastasi a distanza (M) [Owen, 1980]. Tale sistema prevede l'utilizzo di uno studio radiografico per determinare l'estensione della neoplasia primaria e l'eventuale presenza di metastasi a distanza.

Il secondo, pubblicato nel 1993 da Théon *et al*, suggerisce la classificazione dei tumori endonasali in due stadi, sulla base dell'estensione della neoplasia e del grado di erosione dell'osso. In questo sistema, i cani classificati nello stadio 1 presentano il tumore confinato ad una o entrambe le cavità nasali senza coinvolgimento dei seni frontali. Allo stadio 2 appartengono i cani con neoplasia endonasale bilaterale che si estende ai seni frontali con coinvolgimento osseo [Théon *et al*, 1993].

Alcuni anni dopo, nel 1998, sulla base di uno schema di classificazione utilizzato in medicina umana per i tumori mascellari, venne proposto un terzo sistema di staging per i tumori nasali del cane [Adams *et al*, 1998] in cui, sulla base dello studio tomografico della lesione, vengono identificati 4 stadi. Allo stadio I appartengono pazienti che presentano la lesione neoplastica confinata a livello di cavità nasali, seni paranasali o seni frontali, senza coinvolgimento osseo. Nello stadio II vengono inclusi i pazienti che presentano coinvolgimento osseo ma nessuna invasione delle aeree orbitali, sottocutanee o submucosali. In caso di coinvolgimento di tali aree invece, la neoplasia viene considerata in stadio III. Infine, pazienti che mostrano un'estensione della neoformazione a livello di nasofaringe o questa causa osteolisi della lamina cribrosa dell'etmoide, vengono inclusi nello stadio IV [Adams *et al*, 1998]. Nel 2009, al fine di migliorare tale sistema di stadiazione, venne proposta una modifica, portando a quella che vie-

ne definita stadiazione “di Adams modificata”. In tale sistema, le lesioni che presentano un coinvolgimento del nasofaringe, in precedenza incluse nel IV stadio, vengono incluse nel III stadio. Da questo deriva che, nel IV stadio, vengono inclusi soltanto i pazienti con coinvolgimento della lamina cribrosa [Adams *et al*, 2009].

Tabella 1.1 – Sistemi di stadiazione dei tumori delle cavità nasali del cane.

WHO, Owen, 1980	Théon <i>et al</i> , 1993	Adams <i>et al</i> , 1998	Adams <i>et al</i> , 2009
<p>T Tumore primario</p> <p>T0: Tumore non evidente</p> <p>T1: Tumore unilaterale, minima o assente distruzione ossea</p> <p>T2: Tumore bilaterale con moderato coinvolgimento osseo</p> <p>T3: Tumore invade i tessuti vicini</p> <p>N Linfonodi regionali</p> <p>N0: Nessun coinvolgimento linfonodale</p> <p>N1: Linfonodo ipsilaterale mobile</p> <p>N2: Linfonodo controlaterale o bilaterali mobili</p> <p>N3: Linfonodi fissi/adesi</p> <p>M Metastasi a distanza</p> <p>M1: Assenza di metastasi</p> <p>M2: Presenza di metastasi (inclusi LN a distanza)</p>	<p>Stadio 1</p> <p>Neoplasia unilaterale o bilaterale confinata alle cavità nasali, nessun coinvolgimento dei seni frontali</p> <p>Stadio 2</p> <p>Neoplasia bilaterale estesa ai seni frontali con lisi delle ossa delle cavità nasali</p>	<p>Stadio 1</p> <p>Tumore confinato ad una cavità nasale, seni paranasali, o seni frontali, senza coinvolgimento osseo</p> <p>Stadio 2</p> <p>Coinvolgimento osseo senza evidenza di neoplasia a livello orbitale, sottocutaneo o submucosale</p> <p>Stadio 3</p> <p>Coinvolgimento orbitale, sottocutaneo o submucosale</p> <p>Stadio 4</p> <p>Estensione a livello del nasofaringe e/o coinvolgimento della lamina cribrosa</p>	<p>Stadio 1</p> <p>Tumore confinato ad una cavità nasale, seni paranasali, o seni frontali senza coinvolgimento osseo</p> <p>Stadio 2</p> <p>Coinvolgimento osseo senza evidenza di neoplasia a livello orbitale, sottocutaneo o submucosale</p> <p>Stadio 3</p> <p>Coinvolgimento orbitale, sottocutaneo, submucosale o del nasofaringe</p> <p>Stadio 4</p> <p>Il tumore causa lisi della lamina cribrosa</p>

1.5 Fattori di prognosi

In tutti i pazienti con neoplasie maligne sono rilevabili, sin dalla presentazione clinica iniziale o durante il decorso della malattia, caratteristiche particolari in grado di condizionare la prognosi. Tali fattori prognostici sono legati, oltre che alle peculiarità del tumore primario, anche alle condizioni del paziente e alla tipologia di trattamento instaurato. Conoscere tali informazioni risulta di importanza fondamentale in oncologia, al fine di prevedere il comportamento biologico della neoplasia e la risposta alle varie opzioni terapeutiche, consentendo di definire la strategia terapeutica e il follow-up ottimale per ciascun paziente.

Il reale valore dei fattori prognostici identificati per i tumori nasali del cane rimane, tuttavia, ancora dibattuto [Turek e Lana, 2007].

In letteratura, sono state proposte differenti variabili ai fini prognostici, non sempre poi confermate in studi successivi. In particolare, vengono considerati fattori prognostici:

- **Età superiore ai 10 anni** - Nello studio di La Due *et al*, i pazienti con età superiore ai 10 anni mostravano una sopravvivenza mediana di 6,8 mesi, significativamente inferiore a quella dei cani con meno di 10 anni di età (10,4 mesi) [La Due *et al*, 1999]. Tale dato non viene però confermato in uno studio successivo [Rassnick *et al*, 2006]
- **Sesso del paziente** - Un unico studio piuttosto datato riporta una certa influenza prognostica di questo fattore. Tale indagine vede i pazienti maschi affetti da carcinoma nasale presentare una sopravvivenza mediana inferiore (87 giorni) rispetto a quella delle femmine (106 giorni) e un rischio di sviluppare una neoplasia nasale superiore di 1.3 volte rispetto alla restante popolazione a rischio considerata (pazienti della struttura curante) [Hayes *et al*, 1982]. Studi più recenti non confermano una predisposizione di genere per questi tumori [Théon *et al*, 1993; Henry *et al*, 1998; La Due *et al*, 1999]
- **Presenza di epistassi** - I cani con questa sintomatologia clinica in presentazione, mostrano una probabilità di morire per la neoplasia nasale 2,3 volte superiore a quelli che non la presentano. I tempi di sopravvivenza riportati per i pazienti con o senza epistassi erano di 88 e 224 giorni, rispettivamente [Rassnick *et al*, 2006]

- **Deformità facciale** – La presenza di questo fattore condiziona negativamente la sopravvivenza. Infatti, cani con deformità del profilo facciale al momento della diagnosi, trattati con radioterapia, mostrano tempi di sopravvivenza inferiori rispetto a quelli che non la manifestano (133 giorni e 402 giorni, rispettivamente) [Northrup *et al*, 2001]
- **Stadio tumorale alla diagnosi** - L'influenza prognostica di questo fattore è stata valutata applicando i diversi sistemi di stadiazione delle neoplasie nasali ad oggi proposti (**Tabella 1.1**). Considerando il primo sistema di stadiazione proposto dalla WHO e valutando le caratteristiche della neoplasia primaria sia mediante studio radiografico che tomografico, non emerge un significato prognostico per quanto riguarda lo stadio clinico [Adams *et al*, 1987; Kondo *et al*, 2008]. Théon *et al*, nello studio in cui propongono un nuovo il sistema di stadiazione per le neoplasie nasali basato su indagini radiografiche dimostrano che i cani con tumore in stadio 2 (neoplasia bilaterale estesa ai seni frontali con lisi delle ossa delle cavità nasali) trattati con radioterapia, mostrano un rischio di sviluppare una recidiva 2.3 volte superiore rispetto a quelli in stadio 1 [Théon *et al*, 1993]. Tale risultato non cambia anche quando, utilizzando lo stesso sistema di stadiazione proposto da Théon *et al*, la neoplasia viene indagata mediante esame TC [La Due *et al*, 1999]. L'utilizzo dell'esame TC ha consentito di valutare in maniera più precisa l'estensione della neoplasia e nello studio di Adams *et al*, gli autori, oltre a proporre un nuovo schema di stadiazione delle neoplasie nasali, identificano nello stadio tumorale un importante fattore prognostico. In particolare, cani con neoplasie nasali unilaterali, senza lisi delle ossa circostanti (stadio 1) trattati con protocollo radioterapico curativo presentano tempi di sopravvivenza decisamente superiori rispetto ai pazienti in stadio 4 con invasione della lamina cribrosa (23.4 mesi e 6.7 mesi, rispettivamente) [Adams *et al*, 2009]
- **Coinvolgimento metastatico dei linfonodi regionali e/o a distanza (polmone)** - Cani con metastasi a carico di uno o entrambi i linfonodi regionali o a livello polmonare presentano tempi di sopravvivenza mediana significativamente più brevi rispetto ai cani con sola neoplasia primaria (109 gg e 393 giorni e in altro studio 4.5 mesi e 9 mesi, rispettivamente) [Henry *et al*, 1998; La Due *et al*, 1999]

- **Risoluzione dei segni clinici dopo trattamento** - I tempi di sopravvivenza sono significativamente più lunghi (476 giorni versus 133 giorni) nei pazienti che, in seguito a trattamento radioterapico, mostrano una risoluzione della sintomatologia clinica [Northrup *et al*, 2001]
- **Istotipo tumorale** - La diagnosi istopatologica è uno dei fattori maggiormente indagati, ma nonostante questo, nel corso degli anni sono stati ottenuti risultati spesso contrastanti e ad oggi non esiste un'uniformità di vedute in merito al suo reale significato prognostico. Alcuni studi non hanno evidenziato nessuna correlazione significativa tra istotipo e sopravvivenza dei pazienti trattati con radioterapia [Evans *et al*, 1989; La Due *et al*, 1999; Adams *et al*, 1998]. In uno studio, i pazienti con condrosarcoma nasale trattati con radioterapia, mostravano tempi di sopravvivenza superiori rispetto a quelli dei pazienti con adenocarcinoma [Théon *et al*, 1993]. Secondo quanto riportato da un altro studio, cani con diagnosi istopatologica di sarcoma o adenocarcinoma sottoposti a trattamento radioterapico, mostrano una prognosi migliore rispetto ai casi di carcinoma squamocellulare o carcinoma indifferenziato [Adams *et al*, 1987]. Gli stessi autori hanno però ottenuto risultati contrastanti in due lavori pubblicati successivamente [Adams *et al*, 1998; Adams *et al*, 2009].

Bibliografia

- Adams WM, Withrow SJ, Walshaw R, Turrell JM, Evans SM, Walker MA, Kurzman ID. Radiotherapy of malignant nasal tumors in 67 dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1987;191:311-315.
- Adams WM, Miller PE, Vail DM, Forrest LJ, MacEwen EG. An accelerated technique for irradiation of malignant canine nasal and paranasal sinus tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 1998;39:475-481.
- Adams WM, Kleiter MM, Thrall DE, Klauer JM, Forrest LJ, La Due TA, Havighurst TC. Prognostic significance of tumor histology and computed tomographic staging for radiation treatment response of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2009;50:330-335.
- Belshaw Z, Constantio-Casas F, Brearley MJ, Dunning MD, Holmes MA, Dobson JM. COX-2 expression and outcome in canine nasal carcinomas treated with hypofractionated radiotherapy. *Vet Comp Oncol* 2011;9:141-148.
- Borzacchiello G, Paciello O, Papparella S. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in canine nasal carcinomas. *J Comp Pathol* 2004;131:70-76.
- Bukowski JA, Wartenberg D. Environmental causes for sinonasal cancer in pet dogs and their usefulness as sentinels of indoor cancer risk. *J Toxicol Environ Health* 1998;54:579-591.
- Burk RL. Computed tomographic imaging of nasal disease in 100 dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1992;33:177-180.
- Drees R, Forrest LJ, Chappel R. Comparison of computed tomography and magnetic resonance imaging for the evaluation of canine intranasal neoplasia. *J Small Anim Pract* 2009;50:334-340.
- Evans SM, Goldschmidt M, McKee LJ, Harvey CE. Prognostic factors and survival after radiotherapy for intranasal neoplasms in dogs: 70 cases (1974-1985). *J Am Vet Med Assoc* 1989;194:1460-1463.
- Gamblin FM, Sagartz JE, Guillermo C. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *Am J Vet Res* 1997;58:857-863.
- Ginel PJ, Molleda JM, Novales M, Martin E, Margarito JM, Margarito JM, López R. Primary transmissible venereal tumour in the nasal cavity of a dog. *Vet Rec* 1995;136:222-223.
- Greci V, Stefanello D, Di Giancamillo M, Mortellaro CM. Sinonasal tumor in 3 dogs after successful topical treatment for frontal sinus aspergillosis. *Can Vet J* 2009;50:1191-1194.

- Hahn KA, Matlock CL. Nasal adenocarcinoma metastatic to bone in two dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1990;197:491-494.
- Hahn KA, McGavin MD, Adams WH. Bilateral renal metastases of nasal chondrosarcoma in a dog. *Vet Pathol* 1997;34:352-355.
- Hayes HM, Wilson GP, Fraumeni HF. Carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses in dogs: descriptive epidemiology. *Cornell Vet* 1982;72:168-179.
- Henry CJ, Brewer WG, Tyler JJ, Brawner WR, Henderson RA, Hankes GH, Royer N. Survival in dogs with nasal adenocarcinoma: 64 cases (1981-1995). *J Vet Intern Med* 1998;12:436-439.
- Kaldrymidou E, Papaioannou N, Poutahidis T, Karayannopoulou M, Gruys E, Toliou T, Tsangaris T. Malignant lymphoma in nasal cavity and paranasal sinuses of a dog. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2000;47:457-462.
- Kleiter MK, Malarkey DE, Ruslander DE, Thrall DE. Expression of cyclooxygenase-2 in canine epithelial nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2004;45:255-260.
- Kuehn NF. Nasal computed tomography. *Clin Tech Small Anim Pract* 2006;21:55-59.
- Kondo Y, Matsunaga S, Mochizuki M, Kadosawa T, Nakagawa T, Nishimura R, Sasaki N. Prognosis of canine patients with nasal tumors according to modified clinical stages based on computed tomography: a retrospective study. *J Vet Med Sci* 2008;70:207-212.
- La Due T, Dodge R, Page RL, Price GS, Hauck ML, Thrall DE. Factors influencing survival after radiotherapy of nasal tumors in 130 dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1999;40:312-317.
- Legendre AM. Canine nasal and paranasal sinus tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983;19:115-123.
- MacEwen EG, Withrow SJ, Patnaik AK. Nasal tumors in the dog: retrospective evaluation of diagnosis, prognosis and treatment. *J Am Vet Med Assoc* 1977;170:45-48.
- Medewell BR, Priester WA, Gillette EL, Snyder SP. Neoplasms of the nasal passages and paranasal sinuses in domesticated animals as reported by 13 veterinary colleges. *Am J Vet Res* 1976;37:851-856.
- Naganobu K, Ogawa H, Uchida K, Yamaguchi R, Ohashi F, Kubo K, Aoki M, Kuwamura M, Ogawa Y, Matsuyama K. Mast cell tumor in the nasal cavity of a dog. *J Vet Med Sci* 2000;62:1009-1011.

- Nelson WN, Couto CC. *Small Animal Internal Medicine* 4th ed. Elsevier editore, 2010, pp 213-221.
- Northrup NC, Etue SM, Ruslander DM, Rassnick KM, Hutto DL, Bengtson A, Rand W, Moore AS. Retrospective study of orthovoltage radiation therapy for nasal tumors in 42 dogs. *J Vet Intern Med* 2001;15:183-189.
- Owen LN. *TNM Classification of tumors in domestic animals*, 1st ed. Geneva, World Health Organization 1980;49.
- Park RD, Beck ER, Le Couteur RA. Comparison of computed tomography and radiography for detecting changes induced by malignant nasal neoplasia in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992;201:1720-1724.
- Patnaik AK. Canine sinonasal neoplasms: clinicopathological study of 285 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 1989;25:103-114.
- Rassnick KM, Goldkamp CE, Erb HN, Scrivani PV, Njaa BL, Gieger TL, Turek MM, McNiel EA, Proulx DR, Chun R, Mauldin GE, Phillips BS, Kristal O. Evaluation of factors associated with survival in dogs with untreated nasal carcinomas: 139 cases (1993-2003). *J Am Vet Med Assoc* 2006;229:401-406.
- Reif JS, Bruns C, Lower KS. Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses and exposure to environmental tobacco smoke in pet dogs. *Am J Epidemiol* 1998;147:488-492.
- Saunders JH, van Bree H, Gielen I, de Rooster H. Diagnostic value of computed tomography in dogs with chronic nasal disease. *Vet Radiol Ultrasound* 2003;44:409-413.
- Shiomitsu K, Johnson CL, Malarkey DE, Pruitt AF, Thrall DE. Expression of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor in malignant canine epithelial nasal tumours. *Vet Comp Oncol* 2009;7:106-114.
- Thèon A.P., Madewell B.R., Harb M.F., Dungworth D.L. Megavoltage irradiation of neoplasms of the nasal and paranasal cavities in 77 dogs. *J Am Med Assoc* 1993;202:1469-1475.
- Thrall DE, Robertson ID, McLeod DA, Heidner GL, Hoopes PJ, Rodney L. A comparison of radiographic and computed tomographic findings in 31 dogs with malignant nasal cavity tumors. *Vet Radiol* 1989;30:59-66.
- Turek MM, Lana SE. Canine nasosinal tumors. In: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4th ed., Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, 2007; pp 525-526.
- Wilson DW, Dungworth DL. Tumors of the respiratory tract. In: *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2002:365-373.

Capitolo 2

Esame istopatologico dei tumori delle cavità nasali

2.1 Classificazione istologica dei tumori nasali

I tumori delle cavità nasali del cane sono poco comuni e rappresentano solo l'1% di tutte le neoplasie riscontrabili nel cane [Patnaik *et al*, 1989]. Assumono tuttavia particolare importanza, in quanto circa l'80% è di natura maligna, con prognosi sfavorevole a lungo termine [Legendre *et al*, 1983; Patnaik *et al*, 1989]. I 2/3 delle neoplasie nasali del cane sono di origine epiteliale e la restante parte di natura mesenchimale [Legendre *et al*, 1983; Patnaik *et al*, 1989].

Nei paragrafi seguenti verranno considerati i vari istotipi benigni e maligni di neoplasie nasali, secondo quanto riportato dalla classificazione della World Health Organization (WHO). [Dungworth *et al*, 1999]

2.2 Tumori nasali di origine epiteliale

Tumori benigni

Papilloma - Si tratta di una neoplasia esofitica, costituita da epitelio squamoso, colonnare o pseudostratificato con un pattern di crescita papillare o verrucoso. Questa neoplasia è piuttosto rara e può comparire in forme solitarie o multiple.

Adenoma – Tumore benigno costituito da strutture ghiandolari immerse in stroma collagene. Anche questa forma è piuttosto rara e quando compare si presenta solitaria, ben circoscritta e di piccole dimensioni. Le strutture ghiandolari possono diventare cistiche e contenere al loro interno secrezione mucosa o sierosa.

Tumori maligni

Carcinoma squamocellulare - Si tratta di un tumore estremamente aggressivo e distruttivo localmente. Le cellule si presentano di grosse dimensioni, con abbondante citoplasma eosinofilo, nucleo di grosse dimensioni con uno o più nucleoli al suo interno. Esse sono disposte a formare isole o trabecole ramificate. In questa neoplasia è possibile identificare diversi gradi di differenziazione, a partire dalle regioni basali verso quelle centrali. Il grado di atipia cellulare e nucleare e la frequenza delle figure mitotiche aumenta con l'aumentare del grado di malignità. La presenza delle cosiddette "perle cornee" risulta piuttosto infrequente nei carcinomi squamosi delle cavità nasali (**Figura 1.1**).

Carcinoma a cellule di transizione - Questa neoplasia prende origine dall'epitelio respiratorio non ciliato e risulta costituita da aggregati di dimensioni differenti. Le cellule si presentano di forma cuboidale, poliedrica o colonnare con cromatina in ammassi grossolani, nucleoli prominenti e citoplasma intensamente basofilo con rari vacuoli puntiformi. Questo tumore viene di solito considerato di basso grado e rappresenta nel cane, dopo l'adenocarcinoma, il secondo istotipo più frequente (**Figura 1.2**).

Adenocarcinoma - Si tratta di una neoplasia caratterizzata da strutture ghiandolari contenenti prodotti di secrezione. I *pattern* ghiandolari più frequenti sono quello papillare, tubulo-papillare, acinare o misto. Questi tumori sono formati da cellule di forma cuboidale o ovalare, con evidenti caratteri di atipia citologica e rapporto nucleo-citoplasmatico variabile. A livello nucleare, la presenza di nucleoli multipli di forma e dimensioni differenti rappresenta un indice di malignità. Nel citoplasma è possibile riscontrare la presenza di un singolo voluminoso vacuolo di origine secretoria o di vacuoli multipli di differenti dimensioni. Queste neoplasie si accompagnano spesso alla produzione di muco, riscontrabile come un materiale extracellulare eosinofilo, amorfo e fibrillare (**Figure 1.3 e 1.4**).

Carcinoma adenosquamoso - Tale neoplasia presenta caratteristiche intermedie rispetto a quelle dell'adenocarcinoma e del carcinoma squamocellulare. Le cellule che costituiscono questo tumore si caratterizzano per l'abbondante secrezione di mucina. Da questo deriva la denominazione di carcinoma mucoepidermoide attribuita a questa forma neoplastica.

Carcinoma adenoide cistico - Rappresenta una rara forma tumorale e la sua presenza è stata riportata solo nel cane. Esso prende origine dalle ghiandole submucosali o da ghiandole salivari minori e risulta costituito da cellule di piccole dimensioni, con nucleo ipercromatico e citoplasma basofilo. Tali cellule sono circondate da materiale basofilo o ialino che in alcuni casi si dispone a formare degli spazi cistici, dando origine al caratteristico pattern cribriforme.

Carcinoma a cellule acinari - Si tratta di un carcinoma a basso grado, costituito da cellule simili a quelle delle ghiandole salivari. Le cellule si dispongono in lobuli di tipo solido, acinare o trabecolare, separati da un delicato stroma fibrovascolare.

Carcinoma indifferenziato (anaplastico) - Neoplasia costituita da elementi cellulari di forma rotondeggiante, di aspetto simil-linfoide e con tendenza a formare aggregati irregolari. L'assenza di caratteristiche ben definite in questa forma di carcinoma non permette di differenziarlo, senza il ricorso ad indagini immunohistochemiche, da altre forme neoplastiche quale neuroblastoma, carcinoma neuroendocrino, melanoma amelanotico, linfoma e mastocitoma poco differenziato.

Neuroblastoma olfattorio (estesioneuroblastoma) - Neoplasia piuttosto rara, che prende origine dalla membrana olfattoria, principalmente a livello di turbinati etmoidali. Risulta costituita da cellule di aspetto epiteliale, con tendenza a disporsi a palizzata attorno ad accumuli di materiale fibrillare, formando le cosiddette "rosette". Al fine di distinguere questa tipologia tumorale da altre, quali carcinoma neuroendocrino, carcinoma indifferenziato, linfoma o melanoma, è necessario eseguire colorazioni immunohistochemiche per *neuron-specific enolase* (NSE) o per la proteina S-100.

Carcinoma neuroendocrino - Questo tipo di carcinoma è piuttosto raro negli animali domestici ed è stato riportato solo nel cane e nel cavallo [van Maanen *et al*, 1996; Sako *et al*, 2005]. Le cellule sono disposte a formare cordoni o nidi, separati da esili setti fibrovascolari e si presentano di forma variabile, da rotonda a poliedrica, di piccole-medie dimensioni, provviste di citoplasma granulare eosinofilo con nucleo rotondo centrale e nucleolo prominente. La diagnosi definitiva viene formulata anche in questo caso con il supporto dell'immunohistochemica (NSE, cromogranina A) (**Figura 1.5**).

2.3 Tumori nasali di origine mesenchimale

Le neoplasie nasali di origine mesenchimale originano da tessuti e strutture che circondano le cavità nasali e i seni paranasali, quali tessuti molli, vasi sanguigni, osso o cartilagine. Si caratterizzano per un'incidenza inferiore rispetto ai tumori di origine epiteliale, rappresentando solo un terzo di tutte le neoplasie nasali.

Tumori benigni

Le neoplasie benigne sono decisamente meno frequenti di quelle maligne. Si ricordano **condroma**, **fibroma**, **emangioma**, **mixoma** e **rabdomioma**.

Tumori maligni

Condrosarcoma – Rappresenta la neoplasia mesenchimale più frequentemente riscontrata a carico delle cavità nasali del cane. Il condrosarcoma è costituito da cellule mesenchimali maligne a grado variabile di differenziazione condroide immerse in abbondante matrice extracellulare basofila, che può presentare focali aree di mineralizzazione. Possono essere presenti cellule giganti o multinucleate con nucleo doppio o multiplo. Le figure mitotiche sono generalmente rare [Patnaik *et al*, 1984]. (**Figura 1.6**).

Osteosarcoma – A livello nasale Patnaik *et al* (1984) hanno riscontrato la presenza di quattro diversi sottogruppi di osteosarcoma: fibroblastico, teleangiectasico (angioblastico), osteoblastico e condroblastico. L'osteosarcoma fibroblastico si caratterizza per la presenza di fasci di cellule fusate associate a zone di tessuto osteoide maligno. Il nucleo si presenta ipercromatico e con nucleolo singolo prominente. La variante teleangiectasica presenta spazi vascolari irregolari rivestiti da cellule endoteliali e frammisti alla caratteristica matrice osteoide. Ampie aree di emorragia e necrosi sono state descritte come riscontri comuni. Nell'osteosarcoma osteoblastico le cellule neoplastiche si presentano di forma ovoidale con nucleo in posizione paracentrale e nucleolo di grosse dimensioni. La matrice osteoide può essere da scarsa ad abbondante. Caratteristica principale della variante condroblastica dell'osteosarcoma è la presenza di estese aree di metaplasia condroide con abbondante matrice extraercellulare basofila e sparse aree di mineralizzazione [Patnaik *et al*, 1984].

Altri tumori mesenchimali maligni delle cavità nasali sono **fibrosarcoma**, **emangiosarcoma**, **leiomiosarcoma**, **rabdomiosarcoma** e **mixosarcoma**.

2.4 Altri tumori nasali

Linfoma – Il linfoma nasale è raro nel cane e più frequente nel gatto, in cui generalmente insorge su un substrato di infiammazione cronica. È caratterizzato da cellule linfoidi immature, di medie o grandi dimensioni, con elevato rapporto nucleo-citoplasmatico, cromatina finemente punteggiata, nucleoli ben evidenti e multipli. Il citoplasma si presenta scarso e spesso intensamente basofilo [Marconato *et al*, 2012].

Mastocitoma – Questo tumore può essere facilmente diagnosticato anche citologicamente per la presenza di mastociti di solito ben differenziati e granulati, frammisti a granulociti eosinofili. In questi casi, in diagnosi differenziale va considerata la rinite allergica, anch'essa caratterizzata dalla presenza di eosinofili in percentuale elevata e di rari mastociti ben granulati [Marconato *et al*, 2012].

Tumore venereo trasmissibile – A livello oronasale è possibile riscontrare impianti di questa neoplasia, come conseguenza del lambimento. Le cellule che costituiscono questo tumore si presentano di forma rotondeggiante, con nucleo lievemente dismetrico e pattern cromatinico spesso cordoniforme. Il citoplasma è lievemente basofilo con numerosi vacuoli tondeggianti a margini netti e otticamente vuoti [Marconato *et al*, 2012].

Melanoma maligno – Talvolta si può riscontrare l'estensione a livello nasale di melanomi della cavità orale. Le cellule neoplastiche presentano una morfologia variabile. Possono essere fusiformi, epitelioidi e con vari gradi di pleomorfismo cellulare e nucleare. A livello nucleare è possibile identificare la presenza di nucleoli prominenti e di grosse dimensioni. Le mitosi risultano numerose (>3 in 10 campi a forte ingrandimento) [Goldschmidt *et al*, 1998].

2.5 Marker immunoistochimici di utilità prognostica nelle neoplasie nasali

Ki67

Ki67 è una proteina nucleare costituita dall'assemblamento di due catene polipeptidiche con peso molecolare rispettivo di 345 e 395 kDa.

La proteina Ki67 è stata originariamente definita a partire dall'anticorpo monoclonale Ki67 ed è stata generata immunizzando dei topi con nuclei di cellule di linfoma di Hodgkin della linea L428 [Gerdes *et al*, 1983]. Il nome deriva dalla città di origine (Kiel, in Germania) e dal numero del clone originale nella piastra a 96 pozzetti. L'anticorpo risultava reattivo nei confronti di una struttura nucleare presente unicamente nelle cellule proliferanti. Studi dettagliati sul ciclo cellulare hanno evidenziato che l'antigene era presente nel nucleo delle cellule in fase G1, S, G2 e in mitosi. Le cellule quiescenti e in fase G0 non esprimevano l'antigene Ki67 [Gerdes *et al*, 1984]. Durante l'interfase del ciclo cellulare, l'antigene Ki67 viene identificato unicamente all'interno del nucleo, e nella fase mitotica la quota maggiore di proteina si distribuisce sulla superficie dei cromosomi [Mukaratirwa *et al*, 2005]. Questa proteina nucleare risulta necessaria per la proliferazione cellulare poiché associata con i meccanismi di trascrizione dell'RNA ribosomiale. Dal momento che questo antigene risultava espresso in tutte le cellule proliferanti, sia normali che neoplastiche, divenne subito evidente che tale molecola rappresentava un eccellente marcatore al fine di determinare la frazione di crescita in una data popolazione cellulare [Mukaratirwa *et al*, 2005]. Conseguentemente, l'espressione della proteina Ki67, indagata mediante tecniche immunoistochimiche, è stata oggetto di diversi studi volti a valutare eventuali relazioni esistenti tra la proliferazione cellulare neoplastica e gli aspetti morfologici, clinico-prognostici e molecolari.

MIB-1 è l'anticorpo monoclonale generalmente impiegato per identificare l'antigene Ki67; è specifico per la proteina umana, ma ha una buona cross-reattività nelle specie domestiche e può essere utilizzato di routine nei preparati fissati in formalina e inclusi in paraffina [Cattoretti *et al*, 1992; Webster *et al*, 2007]. In generale, per *Ki67-index* si intende la percentuale media di cellule neoplastiche positive, valutata di solito mediante analisi di immagine, in almeno 5 campi a forte ingrandimento (400x).

Il Ki67-*index* è stato usato come potenziale marcatore diagnostico e prognostico in diversi tumori del cane. Per esempio, è possibile utilizzare la valutazione di questo indice per distinguere l'istiocitoma cutaneo dal tumore venereo trasmissibile [Guvenc *et al*, 2002], l'acantoma infundibolare cheratinizzante dal carcinoma squamocellulare ben differenziato cutaneo [Della Salda *et al*, 2002], permette di differenziare, nell'ambito dei tumori epiteliali polmonari primitivi, i carcinomi squamocellulari dagli adenosquamosi [Griffey *et al*, 1999] e di classificare i plasmocitomi canini extramidollari in diversi gradi [Platz *et al*, 1999]. Nei tumori testicolari del cane, invece, la valutazione dell'indice Ki67 non è risultata di alcun valore diagnostico nel differenziare il seminoma dai tumori delle cellule interstiziali e di Sertoli [Sarli *et al*, 1994]. Nei tumori mammari [Lee *et al*, 2004] e nei melanomi del cane [Bergin *et al*, 2011] il Ki67-*index* permette di distinguere i tumori benigni da quelli maligni, con indice più elevato nelle forme maligne rispetto a quelle benigne.

La maggior parte degli studi che valutano l'espressione dell'antigene Ki67 come marcatore prognostico sono stati eseguiti sui tumori mammari e melanocitici, mastocitoma e linfoma. Diversi studi evidenziano il significato prognostico di questo marker nei tumori mammari del cane e riconoscono che, l'espressione di un elevato indice di Ki67 si correla positivamente ad un aumento del rischio di sviluppare metastasi e ad un intervallo libero da malattia e ad una sopravvivenza inferiori [Pena *et al*, 1998; Nieto *et al*, 2000; Sarli *et al*, 2002; Zuccari *et al*, 2004]. La mancanza di un significato prognostico di questo marker è stata documentata nello studio di Löhr *et al*, (1997). Risultati contrastanti in merito al valore prognostico di questo marcatore sono stati documentati anche per i tumori mammari della donna [Rudas *et al*, 1994; Keshgegian *et al*, 1995].

Nel linfoma del cane, il Ki67-*index* è correlato con il grado istologico del tumore, suggerendo l'utilizzo di questo marker per la classificazione dei linfomi [Fournel-Fleury *et al*, 1997]. Altri tumori nei quali il Ki67 ha un significato prognostico sono i mastocitomi e i melanomi [Abadie *et al*, 1999; Roels *et al*, 1999; Laprie *et al*, 2001; Millanta *et al*, 2002]. Un elevato indice Ki67 nei mastocitomi si associa ad un incremento della mortalità, della percentuale di recidiva e dello sviluppo di metastasi [Abadie *et al*, 1999; Scase *et al*, 2006; Weisse *et al*, 2002].

Per quanto riguarda le neoplasie nasali, in medicina umana, diversi studi hanno dimostrato un'elevata immunoespressione di Ki67 nei pazienti con carcinoma squamocellulare rispetto a quelli affetti da papilloma o con sinusite cronica (gruppo di controllo), a dimostrazione del fatto che, anche per questa tipologia di lesioni, quelle maligne mostrano elevati indici di espressione di Ki67 [Bura *et al*, 2007; Mumbuc *et al*, 2007; Stasikowska-Kanicka *et al*, 2013]. In ambito veterinario, nello studio condotto da Fu *et al* (2014) non è emersa una netta correlazione tra elevato indice di proliferazione e ridotti tempi di sopravvivenza nei cani con carcinoma nasale. Lo stesso studio non ha identificato differenze nell'espressione di Ki67 tra i pazienti che hanno o meno ottenuto ottimi risultati terapeutici con la radioterapia. L'espressione di un basso indice di Ki67, si correla infatti ad una maggiore radioresistenza [Kennedy *et al*, 1997]. In medicina umana, tumori del cavo orale e laringei con elevato Ki67-*index* rispondono meglio alla radioterapia rispetto a quelli con bassi livelli di espressione di Ki67 [Freudlsperger *et al*, 2012; Kropveld *et al*, 1998]. Nei gatti con carcinomi a cellule squamose trattati con la radioterapia, un elevato indice di Ki67 espresso dalla neoplasia, è stato correlato con un più a lungo intervallo libero da malattia [Melzer *et al*, 2006].

COX-2

La ciclossigenasi di tipo 2 (COX-2) è un enzima responsabile della biosintesi dei prostanoidi. Tale processo inizia con la conversione dell'acido arachidonico a prostaglandina G2 (PGG2). PGG2 viene ulteriormente metabolizzata portando alla formazione di una varietà di prostaglandine (PG) e trombossani (TXA) [Taketo, 1998]. Sono stati caratterizzati due isoenzimi, denominati COX-1 e COX-2. COX-1 è un enzima costitutivo, cioè presente in condizioni fisiologiche normali e deputato alla sintesi dei prostanoidi coinvolti nella regolazione di funzioni omeostatiche quali quella gastrointestinale, piastrinica e renale.

La COX-2 è un enzima inducibile, che viene quindi rapidamente prodotto in risposta agli stimoli proinfiammatori, provocando un'esagerata produzione di prostanoidi che contribuiscono alla vasodilatazione, all'edema e alla iperalgesia, caratteristiche dei processi infiammatori. Inoltre, i prostanoidi prodotti attraverso l'attività della COX-2 sembrano essere coinvolti nel controllo di alcuni eventi fisiopatologici a carico dell'apparato riproduttivo femminile, a livello renale e risulta implicato a diverso titolo nella cancerogenesi.

Diversi studi evidenziano il ruolo esercitato da COX-2 nello sviluppo tumorale [Taketo, 1998; Fosslie, 2001; Hinz, Brune, 2002]. COX-2 contribuisce allo sviluppo dei tumori maligni mediante differenti meccanismi specifici, tra cui inibizione dell'apoptosi cellulare, promozione dell'angiogenesi tumorale, aumento della motilità e della capacità di invasione delle cellule tumorali e attività immunomodulante [Fosslie, 2001; Williams *et al*, 1999]. La sovraespressione di questo enzima è stata riscontrata in lesioni precancerose, neoplastiche e metastatiche, a dimostrazione del fatto che questo enzima è presente sin dalle prime fasi del processo di cancerogenesi [Pairet e Engelhardt, 1996]. Nell'uomo, per diverse tipologie tumorali, quali carcinoma mammario [Costa *et al*, 2002], carcinoma del colon e retto [Soumaoro *et al*, 2006], carcinoma esofageo [Bhandari *et al*, 2006] e carcinoma squamocellulare [Kim *et al*, 2002], si è cercato di stabilire il significato prognostico dell'espressione di questo enzima. In tali studi è emerso che per queste tipologie di tumori, la sovraespressione di questo enzima si correlava a tempi di sopravvivenza più brevi.

In medicina veterinaria, COX-2 è stato riscontrato in diversi tumori epiteliali come il carcinoma coloretale, carcinoma prostatico, carcinoma renale, carcinomi a cellule squamose orali e cutanei, tumori mammari, carcinoma a cellule di transizione e in altri tipi di tumore, tra cui il melanoma maligno e l'osteosarcoma [Tremblay *et al*, 1999; Khan *et al*, 2000; Khan *et al*, 2001; Pestili de Almeida *et al*, 2001; Doré *et al*, 2003; Knottenbelt *et al*, 2004; Mohammed *et al*, 2004; Millanta *et al*, 2012]. L'espressione di questo enzima è stata ampiamente documentata anche per i carcinomi nasali, con percentuali di espressione variabili dal 71% al 95% [Borzacchiello *et al*, 2004; Kleiter *et al*, 2004; Impellizeri *et al*, 2008; Belshaw *et al*, 2011].

Il ruolo svolto da COX-2 durante il processo di cancerogenesi risulta oramai comprovato, ma il suo significato prognostico non è stato ancora chiaramente dimostrato. Alcuni studi riportano che, il riscontro mediante esami di immunohistochemical di una sovraespressione di COX-2 in carcinomi mammari di cane e gatto e nell'osteosarcoma appendicolare canino si correla ad una prognosi peggiore [Mullins *et al*, 2004; Millanta *et al*, 2006; Queiroga *et al*, 2005; Queiroga *et al*, 2007]. In merito ai carcinomi nasali, lo studio di Belshaw *et al* (2011) non evidenzia una significatività prognostica dell'espressione di COX-2 per questa tipologia tumorale.

I risultati ottenuti da queste indagini hanno portato allo sviluppo di farmaci anti-infiammatori (FANS) a scopo terapeutico o di prevenzione [Xu, 2002]. Tali farmaci sono in grado di bloccare in maniera più o meno irreversibile il sito di legame dell'enzima cicloossigenasi impedendo in questo modo la sintesi di prostaglandine e dei processi ad essa associati. Le prostaglandine, da una parte intervengono in caso di infiammazione favorendo la comparsa di dolore, gonfiore e rialzo della temperatura ma dall'altra svolgono un ruolo importante nel garantire l'integrità della mucosa gastrica, una normale circolazione renale e un'efficiente funzione piastrinica.

In oncologia umana, COX-2 è riconosciuto come un bersaglio farmacologico promettente per prevenire e trattare con FANS diversi tumori [Harris *et al*, 1999]. In medicina veterinaria, per quanto riguarda il trattamento del carcinoma a cellule di transizione (TCC) vescicale e di quello squamocellulare orale è stata riscontrata una maggiore efficacia dei FANS rispetto alla chemioterapia convenzionale, pur presentando livelli variabili di espressione [Knapp *et al*, 1994; Schmitd *et al*, 2001].

EGFR

L'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR, HER1) fa parte della famiglia HerB, a sua volta inclusa nel gruppo dei recettori tirosin-chinasici con attività enzimatica intrinseca (RTKs) [Graus-Porta *et al*, 1997]. EGFR è una glicoproteina di membrana di 170 kd costituita da un dominio extracellulare N-terminale glicosilato e con due residui cisteinici, tra i quali si trova la regione d'interazione con il ligando, una regione transmembrana e un dominio citoplasmatico C-terminale con attività tirosin-chinasica [Voldborg *et al*, 1997].

EGFR e i suoi due ligandi, *Epidermal Growth Factor* (EGF) e *Transforming Growth Factor- α* (TGF- α) sono stati tra i primi membri di questa famiglia ad essere stati caratterizzati [Plowman *et al*, 1993]. Il legame tra EGFR e i ligandi determina la omo-eterodimerizzazione del recettore e la stimolazione della sua attività chinasica [Olayioye *et al*, 2003]. In particolare, è stato riscontrato che in condizioni di riposo questo recettore si trova in uno stato non fosforilato ed in forma monomeric. Il legame con il ligando promuove l'accoppiamento del recettore con un'altra proteina recettoriale adiacente, in genere HER2, con formazione di un dimero; la dimerizzazione del recettore provoca l'autofosforilazione di specifici residui di tirosina C- terminali del dominio intracellulare. A sua vol-

ta, il recettore attivato fosforila alcune proteine citoplasmatiche (tra cui RAS), che scatenano una serie di reazioni a cascata lungo le vie di trasduzione del segnale che regolano i processi di differenziamento, crescita e proliferazione cellulare, invasione ed adesione cellulare, regolazione dell'apoptosi e dell'angiogenesi [Seymour, 2001].

L'attivazione di EGFR, quindi, influenza tutta una serie di funzioni cellulari che sono essenziali alla regolazione della crescita delle cellule.

Nei tessuti normali l'espressione e la funzione del recettore EGFR è sotto stretto controllo. Un'alterazione della regolazione dell'attività del recettore e quindi la rottura dell'equilibrio tra processi di crescita e di morte cellulare con sbilanciamento a favore dell'iperproliferazione cellulare, può rappresentare l'input allo sviluppo dei tumori [Pringent *et al*, 1992].

La sovraespressione di EGFR svolge un ruolo chiave nella crescita e progressione di molte neoplasie. L'abnorme attività del recettore è strettamente connesso ad un'eccessiva produzione del ligando o del recettore o alla presenza di mutazioni che ne determinano un'attivazione costitutiva. La sovraespressione del recettore determina un aumento dell'attività traduttrice del segnale anche in presenza di livelli fisiologici di fattori di crescita. Nelle lesioni polmonari dell'uomo è stato riscontrato che l'espressione del recettore aumenta progressivamente durante l'evoluzione da lesioni metaplastiche a lesioni preneoplastiche e neoplastiche. Di conseguenza, l'aumento di espressione del recettore viene considerato come un marker precoce di trasformazione maligna [Pao *et al*, 2004].

Il secondo meccanismo alla base di un'attivazione eccessiva del recettore è la presenza di mutazioni genetiche che comportano alterazioni strutturali, come ad esempio la perdita del dominio extracellulare, che impediscono il legame del ligando, rendendo però possibile un'attivazione costitutiva del recettore stesso. In alcuni casi sono coinvolte anche mutazioni puntiformi o delezioni responsabili di alterazioni nel dominio intracellulare, tali da indurre un aumento dell'affinità per l'ATP e quindi dell'attività tirosin-chinasica del recettore, con forti effetti stimolatori sulla proliferazione cellulare.

Questo recettore risulta espresso in diversi tessuti epiteliali durante lo sviluppo embrionale e nervoso [Henson, Gibson, 2006; Sibilìa *et al*, 2007]. La sovraespressione di EGFR risulta ben documentata in diverse tipologie di tumori epi-

teliali dell'uomo quali, carcinoma ovarico, cervicale, endometriale, mammario, uroteliale, esofageo, gastrico, colonrettale e polmonare [Nicholson *et al*, 2001; Dei Tos, Ellis, 2005]. Molteplici studi hanno evidenziato che un aumento del livello di espressione dell'EGFR si correla con una progressione della malattia, una minore sopravvivenza, una scarsa risposta alla terapia e allo sviluppo di resistenza verso i farmaci citotossici [Arteaga, 2003; Veale *et al*, 1993]. Sempre nell'uomo, la sovraespressione di EGFR si riscontra in tumori di testa e collo in stadio avanzato e risulta correlato con una prognosi infausta [Ang *et al*, 2002; Etienne *et al*, 1999].

In medicina veterinaria, la sovraespressione di EGFR è stata riportata in diversi tumori del cane tra cui carcinomi mammari [Gama *et al*, 2009], osteosarcoma [Selvarajah *et al*, 2012], TCC [Hanazono *et al*, 2014] e nei carcinomi nasali [Shiomitsu *et al*, 2009]. L'espressione di EGFR nel carcinoma squamocellulare del gatto rappresenta un marker prognostico negativo [Looper *et al*, 2006].

L'evidente implicazione di HER1 nella regolazione della crescita e della proliferazione cellulare e la sua abnorme attività nelle cellule tumorali ha portato allo sviluppo di nuovi composti ed agenti biologici in grado di bloccare in modo specifico l'attività del recettore, come ad esempio anticorpi monoclonali o piccoli inibitori dell'attività tirosin chinasi (TKI). Diversi studi in vitro e in vivo hanno dimostrato che l'interruzione del segnale dell'EGFR comporta un'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali e/o della vitalità [Woodburn *et al*, 1999]. Nel corso degli anni, gli inibitori di EGFR sono stati utilizzati come agenti singoli, nell'ambito di protocolli multimodali o nei casi che hanno mostrato una resistenza ad altre tipologie di trattamento. La combinazione di farmaci anti-EGFR e radioterapia è stata investigata da diversi gruppi di lavoro, riscontrando, in vitro e in alcuni trials clinici, un incremento della risposta alla radioterapia indotta da queste molecole [Huang, Harari, 2000; Bonner *et al*, 2000; Solomon *et al*, 2003; Bonner *et al*, 2006]. Una sovraespressione di EGFR e TGF α è stata riscontrata nelle cellule tumorali resistenti alle radiazioni ionizzanti, suggerendo che una disregolazione di EGFR rappresenta un importante meccanismo di attenuazione degli effetti citotossici provocati dalla radioterapia [Thariat *et al*, 2007]. In particolare, nell'unico studio che valuta l'espressione di EGFR nei carcinomi nasali del cane, è stata evidenziata una positività nel 54% dei casi [Shiomitsu *et al*, 2009]. L'utilizzo di terapie an-

ti-EGFR per questa tipologia di neoplasie viene suggerita dagli stessi autori anche per potenziare l'efficacia di altri trattamenti impiegati, in particolare della radioterapia, aumentando la radiosensibilità dei tumori [Shiomitsu *et al*, 2009].

VEGF

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e i suoi recettori costituiscono il maggior sistema regolatore dello sviluppo vascolare e ricoprono un ruolo assai importante durante l'embriogenesi (vasculogenesi) e nella formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi). In particolare, esso svolge un ruolo fondamentale e specifico nella neoangiogenesi, regolando la proliferazione, migrazione, permeabilità e sopravvivenza delle cellule endoteliali derivate da vene, arterie e vasi linfatici [Conn *et al*, 1990; Ferrara *et al*, 1992]. Sebbene l'endotelio sia il principale bersaglio, sono stati riportati molti studi sugli effetti mitogeni che riguardano altri tipi cellulari, quali macrofagi, piastrine [Sunderkötter *et al*, 1994; Verheul *et al*, 1997], cheratinociti [Frank *et al*, 1995] e cellule renali mesangiali [Iijima *et al*, 1993]. VEGF è inoltre implicato nell'angiogenesi patologica ed è associato alla crescita tumorale. Differenti studi riferiscono l'espressione di questo fattore in diverse tipologie di cellule tumorali [Boocock *et al*, 1995; Itakura *et al*, 2000]. L'attività di VEGF non si limita al sistema vascolare ma riveste un ruolo importante anche in alcune funzioni fisiologiche dell'organismo come ad esempio l'ematopoiesi [Ferrara *et al*, 1996], guarigione delle ferite [Chintalgattu *et al*, 2003] e sviluppo osseo [Gerber *et al*, 1999].

VEGF è in realtà una famiglia di proteine dimeriche di circa 40 kDa. Questa famiglia è composta da sei membri: VEGF-A (o VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PlGF [Leung *et al*, 1989; Maglione *et al*, 1991; Olofsson *et al*, 1996]. VEGF-A e VEGF-B sono principalmente coinvolti nella regolazione dell'angiogenesi, mentre VEGF-C e VEGF-D sono coinvolti nella linfoangiogenesi. Il VEGF-E è la proteina codificata dal gene del Parapox Orf virus, attiva solo VEGFR2 ed è un potente stimolatore di angiogenesi; il PlGF induce angiogenesi in vivo ed è principalmente espresso nella placenta e nei tumori.

VEGF è rilasciato da molti tipi di cellule e la sua espressione è regolata da citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6 e fattori di crescita come EGF, TGF- α , PDGF, FGF. I livelli di espressione sono regolati anche dalla tensione di ossigeno presente nei tessuti; in condizioni d'ipossia vi è un aumento del rilascio,

attraverso una regolazione a livello trascrizionale. Questa regolazione avviene mediante la stimolazione del fattore trascrizionale HIF-1 α [Claffey *et al*, 1998]. Al contrario, la normoxia induce una down-regolazione della produzione di VEGF e una regressione della formazione dei vasi [Mukhopadhyay *et al*, 1995; Ikeda *et al*, 1995].

Tutti i fattori di crescita inclusi nella famiglia del VEGF esercitano i loro effetti biologici attraverso recettori situati sulla membrana delle cellule endoteliali. In particolare, sono stati identificati tre recettori che legano i vari fattori di crescita al VEGF: VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (Flk1/KDR) e VEGFR3, appartenenti tutti alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici [Ferrara *et al*, 2003]. Il legame del VEGF al proprio recettore garantisce la sopravvivenza delle cellule endoteliali, ne determina la mitogenesi, la migrazione e la differenziazione; induce inoltre la mobilitazione delle cellule progenitrici endoteliali (EPCs) dal midollo osseo nel circolo periferico [Ferrara *et al*, 2003].

Studi *in vitro* dimostrano una sovraespressione di VEGF in cellule di differenti neoplasie umane, quali carcinomi (renali, polmonari, mammari, ovarici, vescicali, gastrointestinali), neoplasie mesenchimali (sarcoma di Kaposi, emangiopericitoma) e neoplasie intracraniche come i glioblastomi e gli emangioblastomi [Papetti, Herman, 2002; Brown *et al*, 1996; Hatva *et al*, 1996].

Nello studio di Takahashi *et al*, è stata riscontrata una sovraespressione di VEGF e del suo recettore sia a carico delle cellule neoplastiche che delle cellule endoteliali contigue al tumore, individuando inoltre, una correlazione tra la crescita del letto vasale tumorale ed un aumento dell'espressione di questo fattore [Takahashi *et al*, 1995].

L'elevata espressione del VEGF è stata associata ad una riduzione dell'intervallo libero da malattia e di sopravvivenza nelle pazienti con carcinoma mammario [Sledge *et al*, 2002; Konecny *et al*, 2004]. Sempre per questo tumore è stata dimostrata l'esistenza di una stretta associazione tra la densità vasale intratumorale e un esito infausto [Papetti e Herman, 2002].

In medicina veterinaria, uno studio evidenzia una maggiore densità vasale nei soggetti con neoplasia mammaria e metastasi, rispetto a quelli con solo il tumore primario e ai soggetti di controllo [Graham *et al*, 1999]. Millanta *et al*, hanno rilevato che il VEGF è sempre espresso nelle cellule epiteliali tumorali del carcinoma mammario della cagna, senza riscontrare, però, una correlazione tra

l'espressione di VEGF e i parametri istologici esaminati, quali tipo di tumore, dimensioni e invasione linfatica e l'outcome clinico della patologia neoplastica [Millanta *et al*, 2006]. Inoltre, sempre nel cane, un aumento della vascolarizzazione del tumore non sembra correlato ad un aumento dell'espressione di VEGF [Millanta *et al*, 2006].

Nell'ambito dell'emangiosarcoma canino, Clifford *et al*, hanno rilevato una differenza significativa fra le concentrazioni plasmatiche di VEGF espresse dai cani sani e da quelli affetti dalla neoplasia, senza tuttavia individuare una correlazione fra concentrazione e progressione della neoplasia [Clifford *et al*, 2001]. Recentemente, è stata valutata la rilevanza clinica delle differenze nelle concentrazioni sieriche di VEGF tra cani con emangiosarcomi splenici e quelli con lesioni non maligne della milza (ematomi) e soggetti sani [Frenz *et al*, 2014]. I livelli sierici di VEGF erano significativamente più alti nei cani con masse della milza rispetto ai cani sani, ma non differivano significativamente tra cani con emangiosarcoma ed ematoma. VEGF ha un potenziale utilità clinica come marcatore diagnostico per cani con lesioni spleniche ma non può essere utile per differenziare le diverse lesioni spleniche [Frenz *et al*, 2014]. Lo stesso tipo di studio è stato effettuato nell'ambito delle neoplasie orali del cane ottenendo il riscontro di elevati livelli sierici di VEGF nei cani con neoplasie maligne rispetto a quelli con tumori benigni e al gruppo di controllo [Sobczykńska-Rak *et al*, 2014]. Si attribuisce in questo modo un valore prognostico al VEGF, considerato utile per la diagnosi precoce di neoplasie orali [Sobczykńska-Rak *et al*, 2014]. La sovraespressione del VEGF è stata riscontrata, nel cane, anche in altri istotipi tumorali tra cui il carcinoma tiroideo [Campos *et al*, 2014], linfoma [Aricò *et al*, 2013], leucemia [Aricò *et al*, 2013] e melanoma orale [Taylor *et al*, 2007]. L'espressione di VEGF nei tumori nasali è stata valutata in un unico studio, che ha riscontrato una positività del 91,7% [Shiomitsu *et al*, 2009]

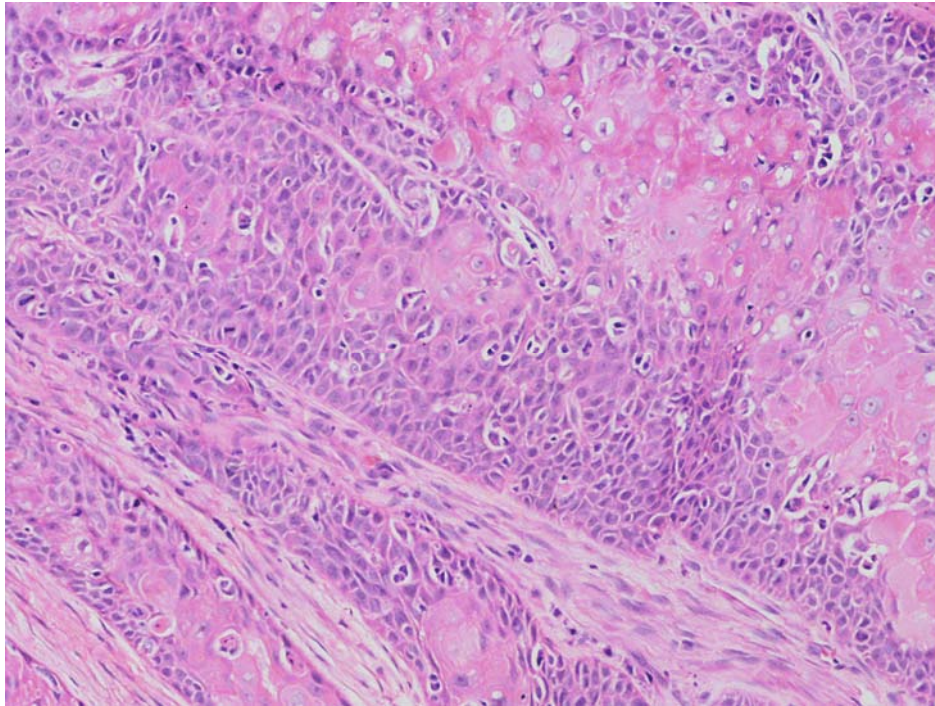


Figura 2.1 – Cane, cavità nasale. Carcinoma Squamocellulare. Ematossilina eosina. 200x.

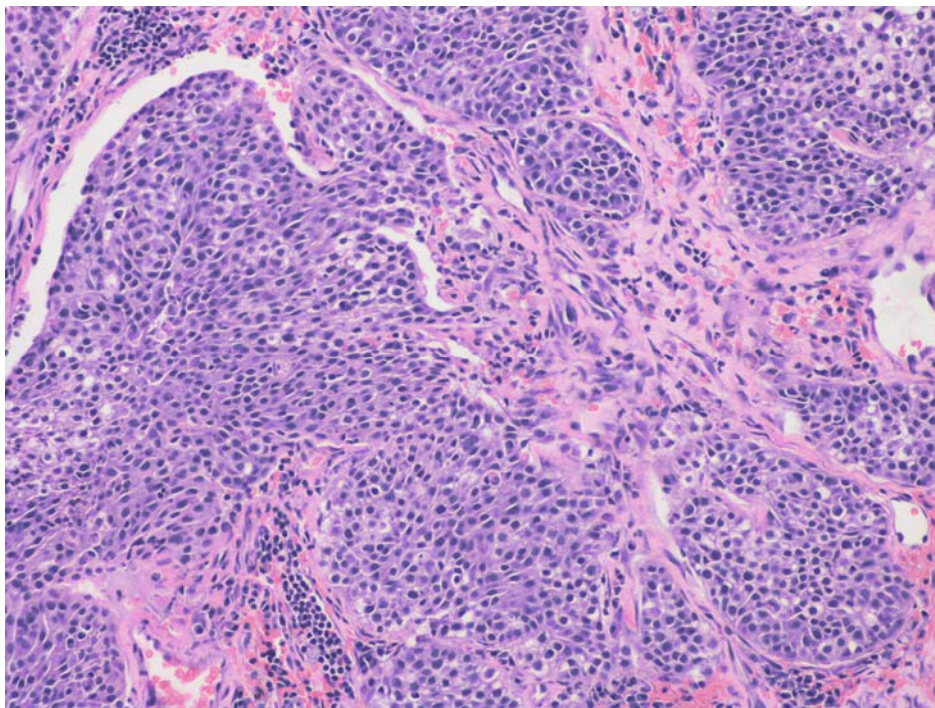


Figura 2.2 – Cane, cavità nasale. Carcinoma a cellule di transizione. Ematossilina eosina. 200x.

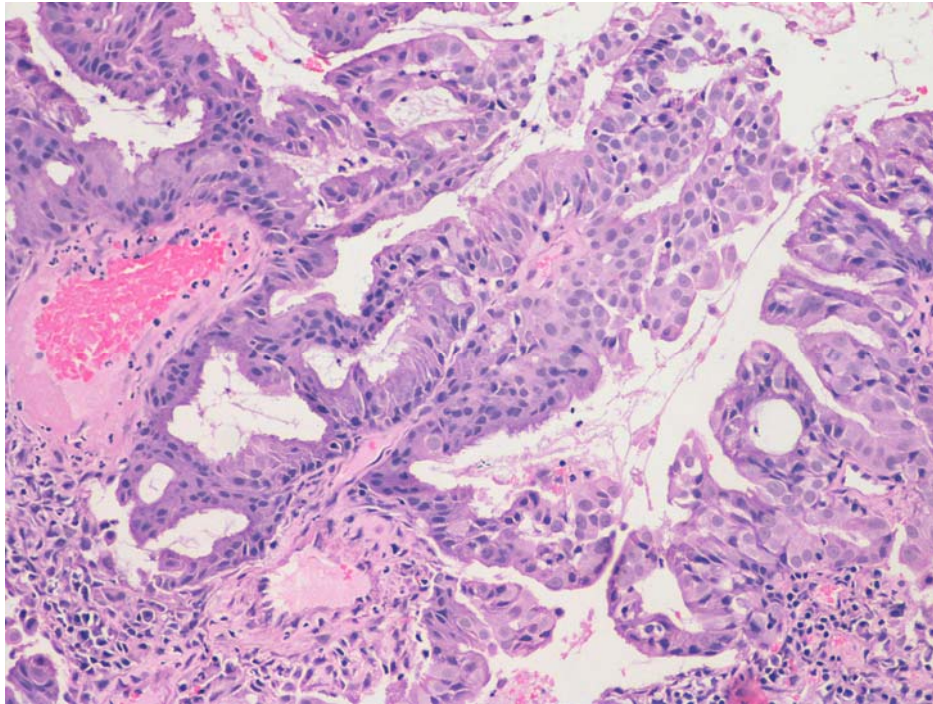


Figura 2.3 – Cane, cavità nasale. Adenocarcinoma papillare. Ematossilina eosina. 200x.

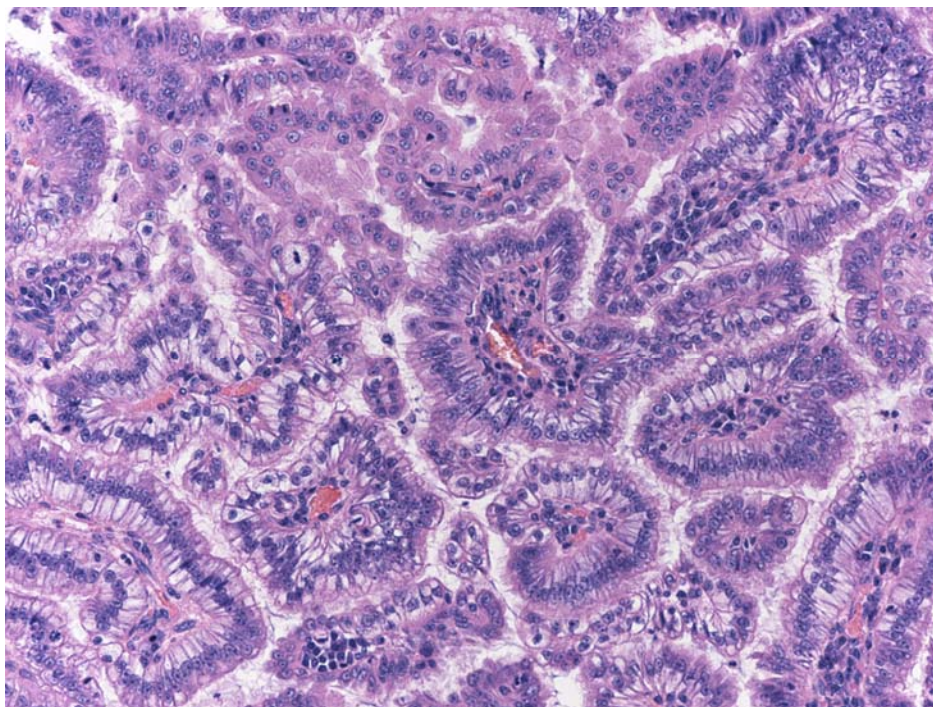


Figura 2.4 – Cane, cavità nasale. Adenocarcinoma acinare. Ematossilina eosina. 200x.

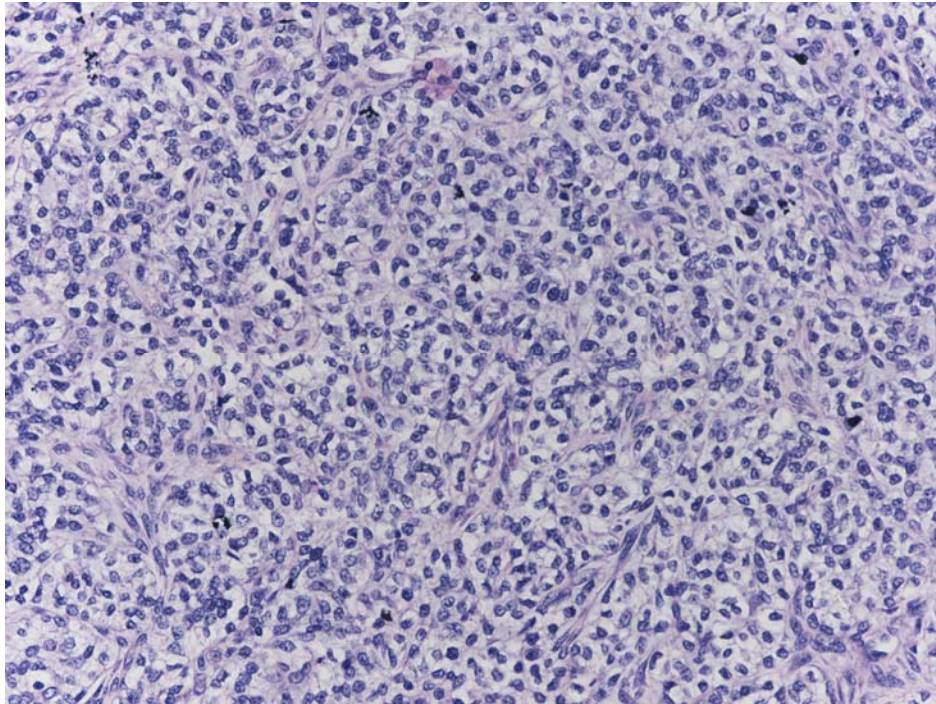


Figura 2.5 – Cane, cavità nasale. Carcinoma neuroendocrino. Ematossilina eosina. 200x.

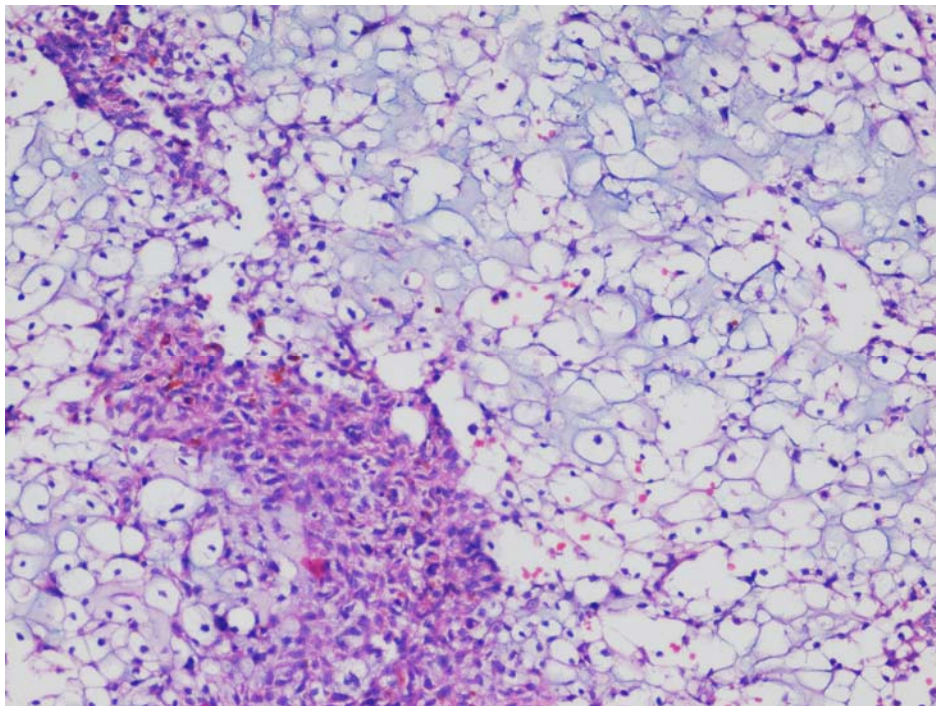


Figura 2.6 – Cane, cavità nasale. Condrosarcoma. Ematossilina eosina. 200x.

Bibliografia

- Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki67 in mast cell tumors from dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1999;215:1629-1634.
- Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Research* 2002;62:7350-7356.
- Aricò A, Giantin M, Gelain ME, Riondato F, Comazzi S, Rütgen BC, Essler SE, Dacasto M, Castagnaro M, Aresu L. The role of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in canine lymphoma: in vivo and in vitro study. *BMC Vet Res* 2013;9:94.
- Aricò A, Giantin M, Gelain M, Riondato F, Mortarino M, Comazzi S, Dacasto M, Castagnaro M, Aresu L. Matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor expression in canine leukaemias. *Vet J* 2013;196:260-262.
- Arteaga CL. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Experimental Cell Research* 2003;284:122-130.
- Belshaw Z, Constantio-Casas F, Brearley MJ, Dunning MD, Holmes MA, Dobson JM. COX-2 expression and outcome in canine nasal carcinomas treated with hypofractionated radiotherapy. *Vet Comp Oncol* 2011;9:141-148.
- Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet Pathol* 2011;48:41-53.
- Bhandari P, Bateman AC, Mehta RL, Stacey BS, Johnson P, Cree IA, Di Nicolantonio F, Patel P. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in patients with surgically resectable adenocarcinoma of the oesophagus. *BMC Cancer* 2006;6:134-143.
- Boocock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, Twentyman PR, Smith SK. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:506-516.
- Bonner JA, Raisch KP, Trummell HQ, Robert F, Meredith RF, Spencer SA, Buchsbaum DJ, Saleh MN, Stackhouse MA, Lobuglio AF, Peters GE, Carroll WR, Waksal HW. Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers.

- Journal of Clinical Oncology* 2000;18:47S-53S.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England Journal of Medicine* 2006;354:567-578.
- Borzacchiello G, Paciello O, Papparella S. Expression of Cyclooxygenase-1 and 2 in canine nasal carcinomas. *J Comp Pathol* 2004;131:70-76.
- Brown LF, Tognazzi K, Dvorak HF, Harrist TJ. Strong expression of kinase insert domain-containing receptor, a vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptor in AIDS-associated Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma. *Am J Pathol* 1996;148:1065-1074.
- Bura M, Seiwerth S, Vladika I, Perović D, Nagy P, Corić M, Bijelić L, Krajina Z, Mitrečić MZ. Possible prognostic significance of p53 and Ki 67 in inverted sinonasal papilloma. *Coll Antropol* 2007;31:545-549.
- Campos M, Ducatelle R, Kooistra HS, Rutteman G, Duchateau L, Polis I, Daminet S. Immunohistochemical expression of potential therapeutic targets in canine thyroid carcinoma. *J Vet Intern Med* 2014;28:564-570.
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J and Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin n microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *Journal of Pathology* 1992;168:357-363.
- Chintalgattu V, Nair DM, Katwa LC. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:277-286.
- Claffey KP, Shih SC, Mullen A, Dziennis S, Cusick JL, Abrams KR, Lee SW, Detmar M. Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell* 1998;9:469-481.
- Clifford CA, Hughes D, Beal MW, Mackin AJ, Henry CJ, Shofer FS, Sorenmo KU. Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med* 2001;15:131-135.
- Conn G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, Hope DA, Thomas KA. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to

- platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990;87:2628-2632.
- Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitão D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclooxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:429-434.
- Dei Tos AP, Ellis I. Assessing epidermal growth factor receptor expression in tumours: What is the value of current test methods? *European Journal of Cancer* 2005;41:1383-1392.
- Della Salda L, Preziosi R, Mazzoni M, Marcato PS. Cell proliferation patterns in canine infundibular keratinizing acanthoma and well differentiated squamous cell carcinoma of the skin. *European Journal of Histochemistry* 2002;46:165-172.
- Doré M, Lanthier I, Sirois J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 2003;40:207-212.
- Dungworth DL, Hauser B, Hahn FF, Haenichen T, Harkema JR. In: *Histological classification of tumors of the respiratory system of domestic animals*. World Health Organ 1999;Volume VI. Second series.
- Etienne MC, Pivot X, Formento JL, Bensadoun RJ, Formento P, Dassonville O, Francoual M, Poissonnet G, Fontana X, Schneider M, Demard F, Milano G. A multifactorial approach including tumoural epidermal growth factor receptor, p53, thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase to predict treatment outcome in head and neck cancer patients receiving 5-fluorouraci. *British Journal of Cancer* 1999;79:1864-1869.
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18-32.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-442.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676.
- Fosslien E. Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 2001;31:325-348.
- Fournel-Fleury C, Magnol JP, Chabanne L, Ghernati I, Marchal T, Bonnefond C, Bryon PA, Felman P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki67 antigen. *J Comp Pathol* 1997;117:61-72.

- Frank S, Hubner G, Breier G. et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995;270:12607–12613.
- Frenz M, Kaup FJ, Neumann S. Serum vascular endothelial growth factor in dogs with haemangiosarcoma and haematoma. *Res Vet Sci* 2014;97:257-262.
- Freudlsperger C, Freier K, Hoffmann J, Engel M. Ki67 expression predicts radiosensitivity in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012;41:965-969.
- Fu DR, Kato D, Watabe A, Endo Y, Kadosawa T. Prognostic utility of apoptosisindex, Ki67 and survivin expression in dogs with nasal carcinoma treated with orthovoltage radiation therapy. *J Vet Med Sci* 2014;76:1505-1512.
- Gama A, Gärtner F, Alves A, Schmitt F. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res Vet Sci* 2009;87:432-437.
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5:623-628.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13–20.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *J Immunol* 1984;133:1710-1715.
- Goldschmidt MH, Dunstan RW, Stannard AA, von Tscherner C, Walder EJ, Yager JA. In: *Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals*. World Health Organ 1998;Volume III, Second series.
- Graham JC, Myers RK. The prognostic Significance of Angiogenesis in Canine Mammary Tumors. *J Vet Intern Med* 1999;13:416-418.
- Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997;16:1647-1655.
- Griffey SM, Kraegel SA, Madewell BR. Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki67 (MIB1) and mitotic counts. *J Comp Pathol* 1999;120:321-332.

- Guvenc T, Haligur M, Orman MN, Haziroglu R. Mitosis and apoptosis in canine cutaneous histiocytoma and transmissible venereal tumour. *Acta Veterinaria Hungarica* 2002;50:315-321.
- Hanazono K, Fukumoto S, Kawamura Y, Endo Y, Kadosawa T, Iwano H, Uchide T. Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Canine Transitional Cell Carcinoma. *J Vet Med Sci* 2014 Sep 16.
- Harris RE, Kasbari S, Farrar WB. Prospective study of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer. *Oncol Rep* 1999; 6:71-73.
- Hatva E, Böhling T, Jääskeläinen J, Persico MG, Haltia M, Alitalo K. Vascular growth factors and receptors in capillary hemangioblastomas and hemangiopericytomas. *Am J Pathol* 1996;148:763-75.
- Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cellular Signalling* 2006;18:2089-2097.
- Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2: 10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:367-375.
- Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6:2166-2174.
- Iijima K, Yoshikawa N, Connolly DT, Nakamura H. Human mesangial cells and peripheral blood mononuclear cells produce vascular permeability factor. *Kidney Int* 1993;44:959-966.
- Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1995;270:19761-19766.
- Impellizzeri JA, Esplin DG. Expression of cyclooxygenase-2 in canine nasal carcinomas. *Vet J* 2008;176:408-410.
- Itakura J, Ishiwata T, Shen B, Kornmann M, Korc M. Concomitant overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2000;85:27-34.
- Kennedy AS, Raleigh JA, Perez GM, Calkins DP, Thrall DE, Novotny DB, Varia MA. Proliferation and hypoxia in human squamous cell carcinoma of the cervix: first report of combined immunohistochemical assays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:897-905.
- Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol* 1995;104:42-49.

- Khan KN, Knapp DW, DeNicola DB, Harris RK. Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am J Vet Res* 2000;61:478-481.
- Khan KN, Stanfield KM, Trajkovic D, Knapp DW. Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol* 2001;38:116-119.
- Kim YB, Kim GE, Cho NH, Pyo HR, Shim SJ, Chang SK, Park HC, Suh CO, Park TK, Kim BS. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer* 2002;95:531-539.
- Kleiter M, Malarkey DE, Ruslander DE, Thrall DE. Expression of cyclooxygenase-2 in canine epithelial nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2004;45:255-260.
- Knapp DW, Richardson RC, Chan TC, Bottoms GD, Widmer WR, DeNicola DB, Teclaw R, Bonney PL, Kuczek T. Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Intern Med* 1994;8:273-278.
- Knottenbelt CM, Simpson JW, Tasker S, Ridyard AE, Chandler ML, Jamieson PM, Welsh EM. Preliminary clinical observations on the use of piroxicam in the management of rectal tubulopapillary polyps. *J Small Anim Pract* 2000;41:393-397.
- Konecny GE, Meng YG, Untch M, Wang HJ, Bauerfeind I, Epstein M, Stieber P, Vernes JM, Gutierrez J, Hong K, Beryt M, Hepp H, Slamon DJ, Pegram MD. Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:1706-1716.
- Kropveld A, Slootweg PJ, Blankenstein MA, Terhaard CH, Hordijk GJ. Ki67 and p53 in T2 laryngeal cancer. *Laryngoscope* 1998;108:1548-1552.
- Laprie C, Abadie J, Amardeilh MF, Net JL, Lagadic M and Delverdier M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Veterinary Dermatology* 2001;12:139-147.
- Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY, Kweon OK. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science* 2004;5:63-69.
- Legendre AM. Canine nasal and paranasal sinus tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983;19:115-123.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angio-

- genic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.
- Löhr CV, Teifke JP, Failing K, Weiss E. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki67 and PCNA. *Vet Pathol* 1997;34:212-221.
- Looper JS, Malarkey DE, Ruslander D, Proulx D, Thrall DE. Epidermal growth factor receptor expression in feline oral squamous cell carcinomas. *Vet Comp Oncol* 2006;4:33-40.
- Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9267-9271.
- Marconato L, Rossi F, Bettini G, Bonfanti U, Buchholz J. Tumori dell'apparato respiratorio. In: *Oncologia Medica Veterinaria e Comparata*. Poletto Editore, 2012.
- Melzer K, Guscetti F, Rohrer Bley C, Sumova A, Roos M, Kaser-Hotz B. Ki67 reactivity in nasal and periocular squamous cell carcinomas in cats treated with electron beam radiation therapy. *J Vet Intern Med* 2006;20:676-681.
- Millanta F, Fratini F, Corazza M, Castagnaro M, Zappulli V, Poli A. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. *Res Vet Sci* 2002;73:45-51.
- Millanta F, Citi S, Della Santa D, Porciani M, Poli A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlations with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Res* 2006;98:115-120.
- Millanta F, Asproni P, Cancedda S, Vignoli M, Bacci B, Poli A. Immunohistochemical expression of COX-2, mPGES and EP2 receptor in normal and reactive canine bone and in canine osteosarcoma. *J Comp Path* 2012;147:153-160.
- Mohammed SI, Khan KN, Sellers RS, Hayek MG, DeNicola DB, Wu L, Bonney PL, Knapp DW. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70:479-483.
- Mukaratirwa S. Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance. A review. *Vet Q* 2005;27:52-64.
- Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS, Sukhatme VP. Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 1995;375:577-581.

- Mullins MN, Lana SE, Dernell WS, Ogilvie GK, Withrow SJ, Ehrhart EJ. Cyclooxygenase-2 expression in canine appendicular osteosarcoma. *J Vet Intern Med* 2004;18:859–865.
- Mumbuc S, Karakok M, Baglam T, Karatas E, Durucu C, Kibar Y. Immunohistochemical analysis of PCNA, Ki67 and p53 in nasal polyposis and sinonasal inverted papillomas. *J Int Med Res* 2007;35:237-241.
- Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* 2001;37:S9–S15.
- Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, Sánchez MA, Flores JM, Castaño M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 2000;37:239-247.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000;19:3159-3167.
- Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2576-2581.
- Pairet M and Engelhardt G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundamentals of Clinical Pharmacology* 1996; 10: 1-17.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:13306-13311.
- Papetti M, Herman IM. Mechanism of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal Physiol Cell Physiol* 2002;282:C947-C970.
- Patnaik AK, Lieberman PH, Erlandson RA, Liu SK. Canine sinonasal skeletal neoplasms: chondrosarcomas and osteosarcomas. *Vet Pathol* 1984;21:475-482.
- Patnaik AK. Canine sinonasal neoplasms: clinicopathological study of 285 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 1989;25:103-114.
- Peña LL, Nieto AI, Pérez-Alenza D, Cuesta P, Castaño M. Immunohistochemical detection of Ki67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 1998;10:237-246.

- Pestili de Almeida EM, Piché C, Sirois J, Doré M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J Histochem Cytochem* 2001;49:867–875.
- Platz SJ, Breuer W, Pflieger S, Minkus G, Hermanns W. Prognostic value of histopathological grading in canine extramedullary plasmacytomas. *Vet Pathol* 1999;36:23-27.
- Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1746-1750.
- Prigent SA, Lemoine NR. The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res* 1992;4:1-24.
- Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Peña L, Lopes C, Illera JC. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Res* 2005;25:4269–4275.
- Queiroga FL, Alves A, Pires I, Lopes C. Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 2007;136:177–185.
- Roels S, Tilmant K, Ducatelle R. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J Comp Pathol* 1999;121:13-24.
- Rudas M, Gnant MF, Mittlböck M, Neumayer R, Kummer A, Jakesz R, Reiner G, Reiner A. Thymidine labeling index and Ki67 growth fraction in breast cancer: comparison and correlation with prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 1994;32:165-75.
- Sako T, Shimoyama Y, Akihara Y, Ohmachi T, Yamashita K, Kadosawa T, Nakade T, Uchida E, Okamoto M, Hirayama K, Taniyama H. Neuroendocrine carcinoma in the nasal cavity of ten dogs. *J Comp Pathol* 2005;133:155-163.
- Sarli G, Benazzi C, Preziosi R and Marcato PS. Proliferative activity assessed by anti-PCNA and Ki67 monoclonal antibodies in canine testicular tumours. *J Comp Pathol* 1994;110:357-368.
- Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G, Marcato PS. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *J Vet Diagn Invest* 2002;14:25-34.
- Scase TJ, Edwards D, Miller J, Henley W, Smith K, Blunden A, Murphy S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with

- prognosis. *J Vet Intern Med* 2006;20:151-158.
- Schmidt BR, Glickman NW, DeNicola DB, de Gortari AE, Knapp DW. Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001;218:1783-1786.
- Selvarajah GT, Verheije MH, Kik M, Slob A, Rottier PJ, Mol JA, Kirpensteijn J. Expression of epidermal growth factor receptor in canine osteosarcoma: association with clinicopathological parameters and prognosis. *Vet J* 2012;193:412-419.
- SeymourLK. Epidermal grown factor receptor as a target: recent developments in search for effective new anti-cancer agents. *Curr Drug Targets* 2001;2:117-33.
- Shiomitsu K, Johnson CL, Malarkey DE, Pruitt AF, Thrall DE. Expression of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor in malignant canine epithelial nasal tumours. *Vet Comp Oncol* 2009;7:106-114.
- Sibilia M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcman M. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 2007;75:770-787.
- Sledge GW Jr. Vascular endothelial growth factor in breast cancer: biologic and therapeutic aspects. *Semin Oncol* 2002;29:104-110.
- Sobczyńska-Rak A, Polkowska I, Silmanowicz P. Elevated Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) levels in the blood serum of dogs with malignant neoplasms of the oral cavity. *Acta Vet Hung* 2014;62:362-371.
- Solomon B, Hagekyriakou J, Trivett MK, Stacker SA, McArthur GA, Cullinane C. EGFR blockade with ZD1839 ("Iressa") potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. Epidermal growth factor receptor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:713-723.
- Soumaoro LT, Uetake H, Takagi Y, Lida S, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M and Sugihara K. Coexpression of VEGF-C and Cox-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis. *Diseases of the Colon and Rectum* 2006; 49: 392-398.
- Stasikowska-Kanicka O, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Immunohistochemical study on survivin in sinonasal tumors and its relationship with the immunoexpression of Ki67 and Bcl-2. *Folia Histochem Cytobiol* 2013;51:225-31.
- Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages

- and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994;55:410-422.
- Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:3964-3968.
- Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1529-1536.
- Taylor KH, Smith AN, Higginbotham M, Schwartz DD, Carpenter DM, Whitley EM. Expression of vascular endothelial growth factor in canine oral malignant melanoma. *Vet Comp Oncol* 2007;5:208-218.
- Thariat J, Yildirim G, Mason KA, Garden AS, Milas L, Ang KK. Combination of radiotherapy with EGFR antagonists for head and neck carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology* 2007;12:99-110.
- Tremblay C, Dore M, Bochsler PN, Si-rois J. Induction of prostaglandin G/H synthase -2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1398-1403.
- van Maanen C, Klein WR, Dik KJ, van den Ingh TS. Three cases of carcinoid in the equine nasal cavity and maxillary sinuses: histologic and immunohistochemical features. *Vet Pathol*. 1996;33:92-95.
- Veale D, Kerr N, Gibson GJ, Kelly PJ, Harris AL. The relationship of quantitative epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer to long term survival. *Br J Cancer* 1993;68:162-165.
- Verheul HM, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, Pinedo HM. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1997;3:2187-2190.
- Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997;8:1197-1206.
- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication, *Vet Pathol* 2007;44:298-308.
- Weisse C, Shofer FS, Sorenmo K. Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002;38:71-73.
- Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation,

cancer and development. *Oncogene* 1999;18:7908–7916.

Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999;82:241-50.

Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs* 2002;13:127–137.

Zuccari DA, Santana AE, Cury PM and Cordeiro JA. Immunocytochemical study of Ki67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet Clin Pathol* 2004;33:23-28.

Capitolo 3

Terapia dei tumori nasali

3.1 Introduzione

La complessità anatomica della sede d'insorgenza e i segni clinici aspecifici fanno sì che la diagnosi delle neoplasie nasali e dei seni paranasali risulti molto spesso tardiva. Caratteristiche di questi tumori sono il comportamento localmente aggressivo e il tasso metastatico piuttosto basso, che fanno sì che ci si orienti generalmente verso un approccio terapeutico locale. Inizialmente la chirurgia rappresentava l'unica opzione terapeutica; con l'avvento della radioterapia in medicina veterinaria, tale metodica è stata impiegata nel trattamento dei tumori nasali come unica modalità terapeutica o in combinazione con chirurgia e chemioterapia. Sin dai primi articoli pubblicati, è emerso che i tempi di controllo locale e di sopravvivenza ottenuti con il trattamento radioterapico erano decisamente superiori a quelli ottenuti con la sola chirurgia o con solo trattamento medico sintomatico. Da allora, sono stati fatti notevoli passi avanti al fine di determinare il protocollo radioterapico più idoneo per ciascun istotipo e stadio tumorale e sono state impiegate tecniche radioterapiche sempre più sofisticate che hanno migliorato l'efficacia terapeutica riducendo sempre più la tossicità.

La chemioterapia riveste un ruolo terapeutico marginale e solitamente viene utilizzata in combinazione con chirurgia e/o radioterapia.

Altre terapie descritte nel trattamento di questi tumori sono la criochirurgia e la terapia fotodinamica.

Le diverse tipologie di trattamento disponibili per i tumori nasali saranno descritte in maniera dettagliata confrontando i dati riportati in letteratura.

3.2 Chirurgia

L'utilizzo della chirurgia per il trattamento dei tumori delle cavità nasali e dei seni paranasali del cane è stato, storicamente parlando, il primo trattamento di scelta, descritto a partire dal 1963 [Spruell *et al*, 1963]. La tecnica chirurgica utilizzata era la rinotomia, con approccio dorsale o ventrale. Tale metodica consiste nella creazione di uno o due *flap* ossei (in caso di rinotomia dorsale), con successiva asportazione della massa tumorale e dei turbinati nasali. Tale tecnica è conosciuta come chirurgia di “debulking”, poiché lo scopo è appunto la sola rimozione della massa (“bulk”) neoplastica macroscopicamente visibile [Fossum, 2004]. Negli anni a seguire, grazie ai risultati iniziali piuttosto incoraggianti, la terapia chirurgica è diventata quella di elezione [Denny *et al*, 1975; Madewell *et al*, 1976]. Nel 1988 Laing e Binnington riportavano in 15 cani con neoplasia nasale (carcinomi e sarcomi) sottoposti a chirurgia, una sopravvivenza mediana di 9 mesi. I cani con coinvolgimento di una sola cavità nasale mostravano tempi di sopravvivenza superiori a quelli con neoplasia estesa bilateralmente (11 e 3 mesi, rispettivamente) [Laing e Binnington, 1988]. Nello stesso studio, istotipo e stadio tumorale non mostravano alcuna influenza prognostica.

Altri report pubblicati negli stessi anni non confermavano questi dati, riportando tempi di sopravvivenza simili a quelli dei cani non trattati, percentuali di recidive piuttosto elevate ed effetti collaterali conseguenti alla chirurgia (emorragie e lesioni a carico del cervello) [MacEwen *et al*, 1977; Norris, 1979; Beck, Withrow, 1985]. Negli anni a seguire, per queste ragioni e grazie all'introduzione della radioterapia in medicina veterinaria, la chirurgia come unico trattamento per queste forme neoplastiche è stata gradualmente sostituita e/o affiancata alle altre tipologie di trattamento.

3.3 Radioterapia

Principi generali

La radioterapia (RT) è una pratica medica nata circa un secolo fa che ha come obiettivo principale il trattamento di pazienti affetti da patologie neoplastiche o, più raramente, non neoplastiche. Questa metodica è ampiamente utilizzata in oncologia umana e, da circa 20 anni, sempre più frequentemente, anche in medicina veterinaria.

La radioterapia prevede l'utilizzo di radiazioni ionizzanti con lo scopo di distruggere le cellule tumorali. Il danno cellulare deriva principalmente dall'azione diretta sul DNA cellulare o indiretta, in seguito alla formazione di radicali liberi citotossici prodotti a partire dall'interazione delle radiazioni con le molecole di acqua intracellulare e la matrice intercellulare [Suntharalingam *et al*, 2005]. Mediante questo meccanismo indiretto vengono danneggiati anche i vasi tumorali che portano sostentamento al tumore. Le radiazioni non hanno un'attività selettiva nei confronti delle cellule neoplastiche e lo stesso danno subito da questi elementi si verifica a carico delle cellule che vanno a costituire i tessuti sani situati in prossimità della neoplasia. La differenza è che le cellule dei tessuti normali possiedono meccanismi naturali di riparazione del DNA, mentre quelle tumorali non hanno questa capacità e sono, pertanto, maggiormente esposte ad un danno da radiazioni [Suntharalingam *et al*, 2005; Hall, Giaccia, 2011]. In particolare, la dose per frazione, il numero di sedute e l'arco temporale durante il quale queste vengono somministrate, influiscono sulla tolleranza dei tessuti normali e sul controllo del tumore [Suntharalingam *et al*, 2005; Hall, Giaccia, 2011]. Un efficace trattamento radioterapico deve quindi basarsi su conoscenze di radiobiologia che permettano di scegliere dose totale e frazionamento appropriati in base alla tipologia e localizzazione del tumore. Questo consente di somministrare una dose più elevata di radiazioni a livello tumorale riducendo al minimo i possibili effetti collaterali a carico dei tessuti normali con conseguente incremento delle probabilità di successo terapeutico. Ad esempio, in presenza di masse tumorali particolarmente estese e/o vicine a occhi ed encefalo, la dose totale viene ridotta, preferendo attenuare la potenzialità terapeutica e diminuendo nello stesso tempo il rischio di produrre effetti collaterali importanti.

Lo schema di frazionamento della dose è di fondamentale importanza e, anche in medicina veterinaria, vengono utilizzati diversi tipi di protocollo, variabili a seconda del risultato che si intende raggiungere. Quando il trattamento ha come obiettivo l'eradicazione della neoplasia (intento curativo) si somministrano piccole dosi quotidiane di radiazioni. Ciò consente di applicare una dose totale elevata, necessaria per distruggere le cellule tumorali e risparmiare quelle dei tessuti sani circostanti. Queste ultime hanno, infatti, la capacità di riparare il danno da radiazioni più velocemente ed efficacemente rispetto alle cellule neoplastiche riportando così danni più contenuti. Nei casi in cui la prognosi è influenzata negativamente da uno stadio tumorale avanzato, da scadenti condizioni cliniche del paziente o da problemi concomitanti si opta di solito per un trattamento più breve (cosiddetto palliativo). Per questi pazienti non è possibile controllare la neoplasia in maniera definitiva ed il trattamento radioterapico ha la finalità di migliorare la qualità di vita dell'animale grazie ad un controllo temporaneo della sintomatologia algica e delle alterazioni funzionali che frequentemente si associano al tumore.

Tuttavia al fine di limitare l'insorgenza di effetti collaterali, risulta di fondamentale importanza la pianificazione radioterapica. Grazie all'utilizzo di apparecchiature e di sistemi di posizionamento sempre più precisi (**Figura 3.1**), è possibile limitare in maniera accurata l'azione del fascio radiante sul tumore, risparmiando organi e tessuti sani circostanti. L'evoluzione tecnologica ha consentito di migliorare la precisione con la quale si identificano i volumi da trattare, mediante impiego di moderne apparecchiature diagnostiche quali la Tomografia Assiale Computerizzata (TAC), TAC-PET (Tomografia ad emissione di positroni, ancora poco diffusa in ambito veterinario) o la Risonanza Magnetica (RM). Sistemi computerizzati permettono di ricostruire tridimensionalmente l'anatomia del paziente, l'esatta distribuzione della dose sul bersaglio e moderne tecniche radioterapiche, quali l'IMRT (Intensity Modulation Radiation Therapy), consentono di variare l'intensità del fascio radiante nell'area da trattare, rendendo la tecnica radioterapica sempre più precisa ed efficace.

Tecniche radioterapiche

Differenti sono le tecniche radioterapiche oggi disponibili. In campo veterinario, quelle principali sono rappresentate dalla *brachiterapia* e dalla *teleterapia*. La prima metodica, conosciuta anche come radioterapia interna, prevede il posi-

zionamento di sorgenti radioattive all'interno o in prossimità della zona da trattare. Questo consente di somministrare dosi elevate di radiazioni direttamente in un sito confinato, l'area tumorale, preservando i tessuti a rischio circostanti. L'impianto di sorgenti radioattive nell'animale comporta un'emissione continua di radiazioni. Di conseguenza, subentrano problemi gestionali del paziente che deve essere isolato dal proprietario, in quanto fonte di contaminazione radioattiva. Per tale ragione l'uso di questa metodica in medicina veterinaria è piuttosto limitato.

La teleterapia è sicuramente più diffusa ed utilizzata e consiste nella somministrazione di fasci esterni di radiazioni emesse da una sorgente posta a distanza del tumore. Un'ampia gamma di energie viene prodotta da differenti tipologie di macchine, divise in due grossi gruppi: apparecchi da ortovoltaggio e megavoltaggio [Suntharalingam *et al*, 2005]. I primi producono radiazioni di bassa energia (150-350 kilovolt) e venivano utilizzati in passato principalmente per il trattamento di lesioni superficiali, con spessore variabile da qualche millimetro a pochi centimetri (a 2 cm di profondità la dose si riduce di circa il 90%) [Suntharalingam *et al*, 2005]. Con tale metodica, a causa dell'effetto fotoelettrico, si ha l'assorbimento di gran parte della dose nei tessuti ad elevato numero atomico, come ad esempio l'osso. Tale caratteristica può causare dei problemi nei casi in cui risulti necessario irradiare volumi contenenti strutture di varia densità, con una probabilità maggiore di avere effetti collaterali a carico di osso e cute.

Nel corso degli anni gli apparecchi ad ortovoltaggio sono stati gradualmente sostituiti da unità a megavoltaggio, quali cobalto 60 e acceleratori lineari. La principale differenza tra queste due tipologie di macchinari è rappresentata dalla diversa modalità di produzione delle radiazioni. Nella cobalto 60 viene utilizzata una sorgente radioattiva situata nella testata della macchina e i raggi γ prodotti vengono convogliati sulla sorgente da irradiare grazie all'ausilio di collimatori [Suntharalingam *et al*, 2005]. Tale metodica tuttavia, pecca di imprecisione a causa di un'ampia zona di penombra e conseguenti limiti del campo non netti, rendendo difficoltoso il trattamento di ampie aree localizzate in prossimità di organi a rischio. Anche in medicina veterinaria è ormai diffuso l'utilizzo di acceleratori lineari (**Figura 3.2**). In queste macchine le radiazioni vengono prodotte bombardando dei bersagli anatomici con elettroni di alta energia. Gli elettroni, opportunamente diretti da limitatori (o collimatori) si possono utilizzare

direttamente per l'irradiazione di lesioni superficiali oppure vengono convogliati verso una lamina di tungsteno posta nella testata della macchina ed utilizzati per la produzione di raggi X (fotoni) ad alta energia, necessari per il trattamento di lesioni situate più in profondità [Suntharalingam *et al*, 2005]. Questa tipologia di radiazioni viene solitamente utilizzata per il trattamento delle lesioni nasali. Tale tecnica richiede l'esecuzione della cosiddetta TAC di centratura che viene effettuata con l'animale sistemato all'interno di particolari sistemi di posizionamento (di solito box in plexiglass, cuscino sgonfiabile, calco dentale) che verranno riutilizzati durante le successive sedute di radioterapia, permettendo di riposizionarlo nella stessa maniera. Mediante la cosiddetta 3D-CRT (Radioterapia Tridimensionale Conformazionale) il volume tumorale è ricostruito in tre dimensioni e assieme ad esso gli organi critici circostanti (**Figura 3.3**). Un computer dedicato alla pianificazione (TPS, Treatment Planning System) consente di utilizzare le immagini ottenute mediante TAC per pianificare il trattamento e valutare la distribuzione tridimensionale della dose a livello del tumore e degli organi adiacenti. Al fine di valutare la dose ricevuta da ciascuna struttura inclusa nel campo di irradiazione vengono creati e analizzati degli istogrammi dose-volume del tumore e degli organi a rischio. Il piano ideale è quello che prevede la somministrazione del 100% della dose al 100% del volume tumorale. Sono considerate accettabili variazioni del 5 – 7,5%.

Lo sviluppo di tecniche avanzate (*i.e.* 3DCRT vs 2DCRT) non consente tuttavia di eliminare i limiti legati all'impossibilità di aumentare la dose radiante rivolta al tumore, senza al contempo procurare un aumento degli effetti collaterali agli organi sani circostanti. All'aumentare della dose totale radiante si otterrebbe idealmente un migliore risultato terapeutico, con un maggiore controllo locale del tumore; studi effettuati al fine di valutare l'efficacia della somministrazione di una maggiore dose in alcune porzioni del volume tumorale da irradiare (boost) non hanno riscontrato una maggiore efficacia di questa tipologia di trattamento, scoraggiandone l'impiego a causa dell'insorgere di maggiori effetti collaterali [Thrall *et al*, 1993].

Nella terapia dei tumori endonasali, una potenziale soluzione per limitare gli effetti collaterali ai tessuti sani, è rappresentata dalla radioterapia ad intensità modulata o IMRT (*Intensity Modulated Radiation Therapy*). Si tratta di una tecnica avanzata di trattamento radioterapico conformazionale che combina fasci

multipli modulati nell'intensità, permettendo un significativo vantaggio rispetto alle tecniche conformazionali 2D o 3D. Questa tecnica infatti, rende possibile la somministrazione di una dose maggiore al volume bersaglio, a fronte di una contemporanea riduzione della dose ai tessuti sani circostanti [Gutierrez *et al*, 2007; Hunley *et al*, 2010]. Nello studio di Lawrence *et al* (2010), è stata comparata la tossicità oculare in un gruppo di cani trattati con IMRT con un altro gruppo trattato con la tecnica 2DCRT. Per quanto riguarda i tempi di sopravvivenza riportati per i due gruppi, non si registravano significative differenze (420 vs 411 giorni) ma la dose diretta agli occhi è nettamente inferiore nel gruppo trattato con IMRT, con una tossicità oculare significativamente limitata [Lawrence *et al*, 2010].

Una tecnica emergente ed estremamente accurata che si aggiunge all'IMRT è la radioterapia stereotassica (Stereotactic RT, SRT) che prevede l'utilizzo di dosi superiori ai 30 Gy rilasciate in 2-3 frazioni, ognuna da 12-15 Gy. L'estrema precisione di questa tecnica permette infatti, il rilascio di elevate dosi per singola frazione e, al contempo, minori effetti collaterali rispetto alle tecniche tradizionali [Curtis *et al*, 2010; Glasser *et al*, 2014].

La radioterapia come unico trattamento per le neoplasie nasali

La radioterapia con unità a megavoltaggio (cobalto-60 oppure acceleratore lineare), quale unica modalità terapeutica, è considerata ad oggi il trattamento d'elezione.

Nel corso degli anni, per questa tipologia di tumori, sono stati proposti differenti protocolli, ma ad oggi, non vi è uniformità di consensi in merito al protocollo più indicato. Gli studi differiscono tra loro in molti aspetti, tra cui dose totale utilizzata, frazionamento, tecnica radioterapica, sistema di stadiazione e indagini strumentali effettuate durante il follow-up al fine di valutare la risposta oggettiva al trattamento.

I protocolli radioterapici utilizzati per i pazienti con neoplasie nasali sono essenzialmente di due tipi:

- **Curativo** - Si parla di trattamento curativo in generale quando la radioterapia ha un intento radicale e mira all'eliminazione del tumore e a curare radicalmente la malattia. Considerato l'obiettivo che ci si pone in questo caso, devono essere effettuati esami mirati al fine di valutare lo stadio clinico, dal momento che tale intento di radicalità viene perseguito principalmente

nel momento in cui il paziente presenta un tumore in stadio non avanzato. Tale regime curativo prevede la somministrazione di cospicue dosi totali di radiazioni ripartite in un numero elevato di piccole dosi, solitamente quotidiane. Questo comporta che il protocollo definitivo comprende l'effettuazione di numerose sedute al fine di raggiungere la dose totale prefissata. In ambito veterinario e per i tumori nasali i protocolli curativi prevedono la somministrazione di una dose totale compresa tra 42 e 67 Gy, suddivisa in un numero variabile di sedute da 10 a 20 da 1.5 a 4.5 Gy ciascuna. L'impiego di questi protocolli consente di ottenere tempi mediani di sopravvivenza compresi tra i 6 e i 16,5 mesi [Thèon *et al*, 1993; Thrall *et al*, 1993; Adams *et al*, 1998; La Due *et al*, 1999; Adams *et al*, 2009; Sones *et al*, 2013] (**Tabella 3.1**).

- **Palliativo** - Il trattamento palliativo (o ipofrazionato) ha invece come scopo principale quello di migliorare la qualità di vita del paziente, riducendo l'incidenza o la gravità dei segni clinici. In questo caso la dose totale è inferiore mentre la dose per singola seduta è superiore rispetto ai protocolli curativi. Il numero di sedute è variabile da 1 a 10, la dose per singola seduta è compresa tra i 3 e i 10 Gy mentre la dose totale non supera i 32 Gy [Mellanby *et al*, 2002; Gieger *et al*, 2008; Buchholz *et al*, 2009; Belshaw *et al*, 2011; Fujiwara *et al*, 2013; Tan-Coleman *et al*, 2013]. In letteratura i tempi di sopravvivenza mediani riportati utilizzando i protocolli ipofrazionati sono compresi tra i 5 e i 10 mesi [Mellanby *et al*, 2002; Gieger *et al*, 2008; Buchholz *et al*, 2009; Belshaw *et al*, 2011; Fujiwara *et al*, 2013; Tan-Coleman *et al*, 2013]. I risultati di questo approccio mostrano un miglioramento dei segni clinici nel 66%-100% dei cani, ed una morbosità limitata per quanto riguarda gli effetti collaterali acuti [Mellanby *et al*, 2002; Maruo *et al*, 2011] (**Tabella 3.2**).

Il motivo principale del fallimento della radioterapia nel caso dei tumori delle cavità nasali, è la comparsa di recidiva. In un recente studio condotto da Bommarito *et al* (2011), è stata valutata la risposta del tumore e dei tessuti sani circostanti ad una seconda irradiazione. Lo studio ha valutato 9 cani sottoposti a trattamento radioterapico curativo, che sono stati successivamente reirradiati con protocollo palliativo. Il primo trattamento è consistito nel rilascio di una dose totale media di 50 Gy suddivisi in 18 frazioni. Nel secondo protocollo, in-

vece, è stata utilizzata una dose media di 36 Gy rilasciati in frazioni da 2 Gy. In generale, il tempo mediano di sopravvivenza è risultato di 927 gg con remissione dei segni clinici in 7 cani su 9, anche se la risposta al primo trattamento è stata significativamente migliore. Gli effetti collaterali acuti si sono manifestati in tutti gli animali, 7 dei quali hanno riportato lieve tossicità a livello di cute, occhi e cavità nasali, che non hanno però influito sulla qualità di vita degli stessi. Allo stesso tempo, due cani hanno riportato gravi effetti collaterali tardivi agli occhi con conseguente cecità, motivo per il quale i proprietari hanno scelto l'eutanasia. I pazienti che presentano una crescita tumorale lenta possono quindi beneficiare di un secondo trattamento radioterapico [Bommarito *et al*, 2011]. Per concludere, bisogna ricordare l'utilizzo anche per le neoplasie nasali della brachiterapia, o radioterapia intracavitaria, che prevede l'impiego di isotopi radioattivi impiantati a livello della massa tumorale. Nello studio di Thompson *et al* (1992) condotto su 8 cani, un impianto con iridio-192 è stato applicato nelle cavità nasali in seguito a rimozione chirurgica della massa. Gli animali hanno però mostrato una tossicità elevata, con necrosi dei tessuti nei punti in cui la dose risultava più elevata.

Tabella 3.1 – Confronto tra i principali protocolli curativi utilizzati per il trattamento dei tumori delle cavità nasali nel cane.

	Thrall et al, 1993	Thèon et al, 1993	Adams et al, 1998	Adams et al, 2005	Sones et al, 2013
N° casi	18	77	21	80	86
Dose totale (Gy)	54-57	48	42	42-57	42-60
N° di frazioni	16	12	10	11-19	10-20
Dose per frazione (Gy)	3-4	4	4,2	3 – 4,2	3-4,2
MST (giorni)	177	NR OS 60% a 1 anno OS 25% a 2 anni	428	325	444

Tabella 3.2 – Confronto tra i principali protocolli palliativi utilizzati per il trattamento dei tumori delle cavità nasali nel cane.

	Mellanby et al, 2002	Gieger et al, 2008	Buchholz et al, 2009	Belshaw et al, 2010	Tan-Coleman et al, 2013
N° casi	56	48	38	42	42
Dose totale (Gy)	36	20-40	24-32	34-36	20
N° di frazioni	4	3-5	3-10	4	5
Dose per frazione (Gy)	9	4-10	3-8	8,5-9	4
Sorgente radiante	LINAC	Cob o LINAC	LINAC	LINAC	LINAC
MST (giorni)	212	146	300	201	309

LINAC = linear particle accelerator; Cob = cobalto.

Effetti collaterali

L'impiego di apparecchiature e tecniche sempre più precise consente di concentrare la dose radiante a livello tumorale risparmiando quanto più possibile i tessuti sani circostanti. Il danno a carico di questi tessuti comporta l'insorgenza di effetti collaterali che possono essere acuti o tardivi.

L'obiettivo che si cerca di perseguire sottoponendo un paziente ad un trattamento radioterapico è quello di controllare adeguatamente la sua neoplasia causando meno effetti collaterali possibili. Tali complicazioni insorgono a carico delle strutture comprese nell'area trattata e la loro entità varia a seconda della tolleranza dei tessuti alle radiazioni, della dose somministrata e della tipologia di frazionamento della stessa. Gli effetti sui tessuti normali vengono suddivisi in alterazioni che si manifestano nel periodo compreso tra le ultime sedute del protocollo radioterapico e le prime settimane dopo l'irradiazione (effetti acuti) e alterazioni che compaiono dopo molti mesi o anni dalla fine della RT (effetti tardivi), secondo quanto stabilito dal *Veterinary Radiation Therapy Oncology Group* (VROG) [La Due e Klein, 2001].

La rapidità di insorgenza di queste lesioni è legata al turnover cellulare del tessuto irradiato. Per questa ragione gli effetti collaterali acuti compaiono principalmente a carico di tessuti ricchi di substrati cellulari in riproduzione come cute e mucose. La tossicità acuta cutanea è spesso riscontrata nei pazienti e può variare da eritemi, dermatiti, desquamazione secca, alopecia, aree di desquamazione umida, fino ad aree ulcerate. La maggior parte dei pazienti irradiati per neoplasie nasali presenta una dermatite a livello della cute compresa nel campo. La comparsa di tale effetto può determinare fastidio e prurito che possono portare l'animale a grattare la parte con conseguente dilazione dei tempi di guarigione. Gli effetti collaterali a carico della mucosa nasale (rinite) si manifestano con la comparsa di starnuti e scolo nasale. A causa della vicinanza delle cavità nasali al cavo orale, il trattamento radioterapico di queste strutture determina la comparsa di mucosite in tale sede. Di solito, queste lesioni sono asintomatiche ma nei casi più gravi si può avere disfagia, aumento della salivazione e riluttanza ad assumere cibo e bevande. A livello oculare gli effetti collaterali acuti che possono comparire sono rappresentati da blefarite, congiuntivite, cheratite o cheratocongiuntivite secca.

La rapidità di riparazione di queste lesioni dipende dalla rapidità di ripopolamento delle cellule danneggiate. Tali effetti sono tutti di natura autolimitante e transitoria. In genere, mucosite e dermatite persistono per 7-10 giorni dalla loro comparsa, dopodiché inizia la guarigione. La ricrescita del pelo richiede un periodo di tempo più lungo, in genere qualche mese e i peli presentano consistenza e colore differente (spesso grigio o bianco).

Gli effetti tardivi insorgono molto più lentamente e sono dovuti al danneggiamento dei vasi e del tessuto connettivo presenti nella parte irradiata. La comparsa di questi effetti è strettamente legata alla dose totale somministrata e al frazionamento della stessa. La tipologia di effetto tardivo varia a seconda del tessuto irradiato e in genere si tratta di lesioni irreversibili e talvolta progressivi. Queste lesioni radioindotte possono manifestarsi a carico di tessuti vascolari, connettivali, nervosi e ossei, tutti caratterizzati da un turnover cellulare lento e possono portare ad alterazioni quali fibrosi, necrosi, ulcerazioni e insorgenza di tumori secondari. Gli effetti collaterali tardivi sono rari; tuttavia, essendo piuttosto gravi, hanno impatto negativo sulla qualità di vita del paziente. Nel caso di irradiazione delle cavità nasali, i tessuti che possono essere coinvolti sono la cute (iperpigmentazione, leucotrichia e fibrosi), il cristallino (con conseguente comparsa di cataratta), la cornea (cheratite, cheratocongiuntivite secca), l'uvea anteriore (uveiti), la retina (emorragia e degenerazione), il tessuto nervoso cerebrale (necrosi cerebrale, degenerazione del nervo ottico) e l'osso (osteonecrosi).

Radioterapia e chirurgia

Con l'intento di aumentare la probabilità di successo terapeutico, nel corso degli anni sono stati pubblicati numerosi studi che valutano l'associazione tra radioterapia e chirurgia. I primi studi riportavano risultati incoraggianti con tempi di sopravvivenza mediani di circa 23 mesi e buona tollerabilità al trattamento [Thrall *et al*, 1983]. Studi eseguiti pochi anni dopo mettevano già in discussione il beneficio apportato dalla chirurgia nel trattamento di queste neoplasie rispetto alla sola radioterapia [Adams *et al*, 1987; Henry *et al*, 1998; Northrup *et al*, 2001]. Morris *et al*. (1994) hanno valutato per la prima volta l'efficacia del trattamento radioterapico con moderne unità a megavoltaggio associato a chirurgia rispetto alla sola radioterapia. Tale studio non riporta tuttavia differenze statisticamente significative tra i due gruppi [Morris *et al*, 1994].

Nonostante questo, anche in tempi più recenti, l'impiego combinato di chirurgia e radioterapia ha continuato a destare interesse. Nel 2005 è stato pubblicato uno studio retrospettivo su 53 cani, dei quali il gruppo sottoposto a chirurgia dopo radioterapia curativa (dose totale 42 Gy, suddivisa in 10 sedute) ha mostrato un tempo mediano di sopravvivenza significativamente più lungo (47,7 mesi), rispetto agli animali trattati con la sola radioterapia (19,7 mesi) [Adams *et al*, 2005]. Al contempo però, la chirurgia delle cavità nasali comportava un significativo aumento degli effetti collaterali riscontrati, come grave rinite, osteomielite ed osteonecrosi in una percentuale piuttosto elevata di pazienti. Tale approccio permetteva quindi di ottenere da un lato un ottimo risultato terapeutico, ma sottoponeva gli animali al rischio di gravi effetti collaterali, vanificando in questo modo i ragguardevoli successi ottenuti. In un recente studio di Bowles *et al* (2014) il tempo mediano di sopravvivenza di 16 cani trattati con radioterapia curativa (dose totale 54 Gy, suddivisa in 18 frazioni) seguita dalla chirurgia, era di 457 giorni. Pur non riscontrando gravi effetti collaterali tardivi, gli autori hanno concluso che l'utilizzo di un protocollo radioterapico curativo seguito dalla chirurgia porta a un risultato, in termini di sopravvivenza, simile a quello ottenuto con l'utilizzo della sola radioterapia curativa.

I risultati disponibili in letteratura portano quindi ad opinioni contrastanti. Ad oggi, il trattamento di elezione rimane quello radioterapico. Come detto in precedenza l'utilizzo della sola chirurgia non è considerato risolutivo nel trattamento dei tumori endonasali, in quanto l'invasione ossea occorre presto nella patogenesi e il tumore è spesso localizzato vicino a organi vitali (i.e. occhi e cervello), che rendono impossibile il rispetto dei margini chirurgici. Uno dei vantaggi della terapia radiante rispetto alla chirurgia, consiste nel fatto che con questa tecnica è possibile trattare l'intera cavità nasale, i seni frontali e la porzione di osso eventualmente interessato dal processo neoplastico che non è possibile asportare chirurgicamente.

La chirurgia se associata a radioterapia comporta un aumento degli effetti collaterali tardivi, e nella maggior parte dei casi, senza un prolungamento significativo della sopravvivenza. Infatti, anche in caso di un aumento del MST, gli effetti collaterali tardivi riscontrati hanno scoraggiato l'utilizzo di tale procedura per il trattamento dei tumori delle cavità nasali del cane. Tuttavia, sulla base del recente lavoro di Bowles *et al*, sono necessari ulteriori studi con standardizza-

zione delle procedure, così da poter essere significativamente comparati al fine di verificare l'effettiva utilità del protocollo combinato radioterapia e chirurgia.

3.4 Chemioterapia

L'utilizzo della chemioterapia come unica modalità terapeutica per le neoplasie nasali è stata investigata raramente nel corso degli anni. Nel 1992, Hahn *et al*, hanno utilizzato il cisplatino in monochemioterapia in 11 cani con adenocarcinoma nasale. Gli autori riportano una remissione della sintomatologia clinica dopo 1-2 settimane dall'inizio della chemioterapia, due casi di remissione completa al controllo radiografico e una sopravvivenza mediana di 20 settimane (5 mesi). Tuttavia, la tendenza sia in medicina umana che veterinaria, è quella di combinare diversi farmaci. Anche per le neoplasie nasali è stata valutata l'efficacia di un protocollo che prevede la somministrazione alternata di doxorubicina e carboplatino associati a piroxicam, ottenendo nel 75% dei casi una risposta oggettiva al trattamento e una risoluzione della sintomatologia clinica. In particolare, sulla base degli studi TC, è stata ottenuta una remissione completa in 4 casi, in 2 cani remissione parziale e in 2 malattia stabile [Langova *et al*, 2004]. Tale approccio terapeutico può rappresentare un'alternativa nei casi in cui non è possibile ricorrere alla radioterapia. Questi risultati sull'utilizzo della sola chemioterapia nel trattamento delle neoplasie nasali sono incoraggianti, ma il numero di pazienti esaminato è troppo esiguo e, per confermare tali dati, sono necessari nuovi studi includendo un numero rappresentativo di animali.

Radioterapia e chemioterapia

La combinazione di radioterapia e chemioterapia è una pratica diffusa in oncologia. In particolare, vengono utilizzati prodotti chimici o farmaci in grado di aumentare la sensibilità delle cellule tumorali alla radioterapia, interagendo con i meccanismi del danno radioindotto e potenziandone l'effetto. In particolare, i chemioterapici sono in grado di fissare il danno radioindotto con azione sinergica superadditiva (radiosensibilizzanti) o additiva (radiopotenzianti) alla radioterapia. In medicina umana, è stato da tempo dimostrato che la combinazione di queste tecniche terapeutiche, permette un aumento del tempo di sopravvivenza nei pazienti affetti da tumori maligni intracranici, nasali, polmonari, tumori all'esofago, stomaco, pancreas e retto [Crane *et al*, 2001; Lawrence *et al*, 2003].

I chemioterapici finora sperimentati nel trattamento dei tumori nasali del cane, in associazione alla radioterapia, sono i derivati dei sali di platino (cisplatino e carboplatino) ed un antimetabolita, la gemcitabina.

I sali di platino sono dei chemioterapici fase-aspecifici e formano legami covalenti stabili intercatena ed intracatena con il DNA, impedendone la sintesi [Chun, 2007]. Nello studio di Mauldin *et al* (1995) è stata valutata la combinazione di radioterapia a megavoltaggio e carboplatino con risultati non soddisfacenti, in quanto, non è stato riscontrato un aumento della sopravvivenza rispetto al gruppo di controllo che ha ricevuto solo il trattamento radiante. In un altro lavoro, Lana *et al* (1997), hanno impiegato il cisplatino, a cui viene riconosciuto sia un effetto radiosensibilizzante, a causa dell'aumento dei radicali liberi nelle cellule, che un effetto radiopotenziante, in quanto riduce l'abilità delle cellule di riparare i danni a carico del DNA indotti dalle radiazioni [Lana *et al*, 1997]. Tredici cani con tumore delle cavità nasali sono stati trattati con una combinazione di cisplatino a lento rilascio e radioterapia a megavoltaggio. Dai risultati è emerso che, la sopravvivenza mediana era superiore nei cani trattati con cisplatino e radioterapia (580 gg) rispetto a quelli del gruppo di controllo (325 gg), con una buona tolleranza del trattamento. Gli autori hanno perciò concluso che la combinazione di radioterapia e la somministrazione di cisplatino a lento rilascio, può influenzare favorevolmente la sopravvivenza dei cani con tumore alle cavità nasali. Tali risultati sono stati confermati dallo stesso gruppo anche in uno studio successivo [Lana *et al*, 2004].

Gli antimetaboliti sono analoghi strutturali di composti naturali richiesti per la sopravvivenza e divisione cellulare, tra cui basi puriniche e pirimidiniche, nei cui confronti agiscono da antagonisti. Sono agenti fase specifici (fase S), quindi più efficaci nei confronti di tumori con elevata frazione di accrescimento. Il meccanismo d'azione prevede sostituzione di false basi puriniche e pirimidiniche, oppure disattivazione di alcuni enzimi chiave coinvolti nella sintesi di DNA, RNA e proteine [Chun, 2007]. Da numerosi lavori è emerso che, la gemcitabina radiosensibilizza le cellule in fase S diminuendo il pool di deossinucleotidi fosforilati, specialmente deossadenosina trifosfato (dATP) [Lawrence *et al*, 2003]. Con questo meccanismo, si ha una mancata riparazione delle basi danneggiate delle radiazioni. Queste lesioni portano alla morte cellulare, sia per via apoptotica che non apoptotica. Le cellule più soggette a subire il

danno, sono quelle che permangono in maniera inappropriata in fase S a causa di una disregolazione dei checkpoints, condizione che si verifica nelle cellule tumorali. Questo è alla base della selettività di questo farmaco per le cellule neoplastiche rispetto a quelle dei tessuti sani [Lawrence *et al*, 2003]. I dati sull'utilizzo della gemcitabina nei tumori nasali del cane sono tuttavia scarsi e non sempre positivi. Nello studio di LeBlanc *et al* (2004), 15 cani con neoplasia nasale venivano sottoposti a trattamento radioterapico curativo e contemporanea somministrazione di gemcitabina a dosi radiosensibilizzanti (50 mg/m²). In questo studio viene riportata la comparsa di gravi effetti collaterali acuti legati alla radioterapia e una tossicità ematologica inaspettata senza un significativo aumento dei tempi di controllo di queste lesioni.

3.5 Altre terapie

Nel corso degli anni, per il trattamento dei tumori endonasali del cane, sono stati indagati altri approcci terapeutici locali. Tra questi ricordiamo l'immunoterapia, la crioterapia e la terapia fotodinamica (PDT).

Immunoterapia e criochirurgia non portano in genere un aumento significativo del tempo di sopravvivenza degli animali [Withrow, 1982]. Solo in uno studio recente in un cane con recidiva di adenocarcinoma nasale, l'utilizzo della criochirurgia ha portato ad un controllo a lungo termine del tumore [Murphy *et al*, 2011].

La terapia fotodinamica è una procedura medica che si basa sull'utilizzo di un fotosensibilizzante che ha la capacità di accumularsi selettivamente nelle cellule tumorali. Questo è in grado di far produrre alle cellule una sostanza fototossica, che viene attivata quando l'area viene illuminata da una particolare sorgente di luce. L'interazione tra luce e sostanza fototossica produce all'interno della cellula delle molecole di ossigeno molto reattivo, capace di distruggere la cellula dall'interno. Lucroy *et al* (2003) hanno condotto uno studio su tre cani affetti da carcinoma nasale trattati con PDT, ottenendo un buon controllo dei segni clinici (e.g. epistassi, starnuti, scolo) nel breve periodo, ma con risultati poco soddisfacenti a lungo termine.



Figura 3.1 – Sistema di posizionamento individualizzato utilizzato durante le sedute di radioterapia, costituito da box in plexiglass, cuscino sgonfiabile e calco dentale.



Figura 3.2 – Acceleratore lineare (6 MV). Apparecchiatura utilizzata in radioterapia per l'erogazione delle radiazioni.

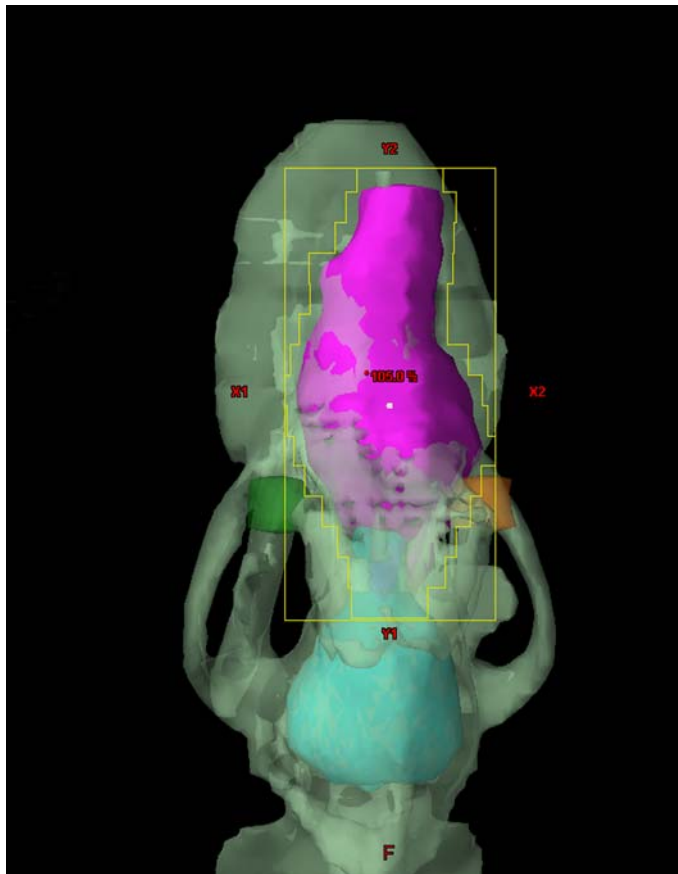


Figura 3.3 – Ricostruzione in 3D di un cranio di un cane con neoplasia nasale.

Bibliografia

- Adams WM, Withrow SJ, Walshaw R, Turrell JM, Evans SM, Walker MA, Kurzman ID. Radiotherapy of malignant nasal tumors in 67 dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1987;191:311-315.
- Adams WM, Miller PE, Vail DM, Forrest LJ, MacEwen EG. An accelerated technique for irradiation of malignant canine nasal and paranasal sinus tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 1998;39:475-481.
- Adams WM, Bjorling DE, McAnulty JE, Green EM, Forrest LJ, Vail DM. Outcome of accelerated radiotherapy alone or accelerated radiotherapy followed by exenteration of the nasal cavity in dogs with intranasal neoplasia: 53 cases (1990-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2005;227:936-941.
- Adams WM, Kleiter MM, Thrall DE, Klauer JM, Forrest LJ, La Due TA, Havighurst TC. Prognostic significance of tumor histology and computed tomographic staging for radiation treatment response of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2009;50:330-335.
- Beck ER, Withrow SJ. Tumors of the canine nasal cavity. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1985;15:521-533.
- Belshaw Z, Constantio-Casas F, Brearley MJ, Dunning MD, Holmes MA, Dobson JM. COX-2 expression and outcome in canine nasal carcinomas treated with hypofractionated radiotherapy. *Vet Comp Oncol* 2011;9:141-148.
- Bommarito DA, Kent MS, Selting KA, Henry CJ, Lattimer JC. Reirradiation of recurrent canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2011;52:207-212.
- Bowles K, DeSandre-Robinson D, Kubicek L, Lurie D, Milner R, Boston SE. Outcome of definitive fractionated radiation followed by exenteration of the nasal cavity in dogs with sinonasal neoplasia: 16 cases. *Vet Comp Oncol* 2014 Sep 2. doi: 10.1111/vco.12115.
- Buchholz J, Hagen R, Leo C, Ebling A, Roos M, Kaser-Hotz B, Bley CR. 3D conformal radiation therapy for palliative treatment of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2009;50:679-683.
- Chun R, Garrett L, Vail DM. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 4th ed., Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, 2007; pp 181-182.
- Crane C, Wolff R, Abbruzzese JL. Combining gemcitabine with radiation in pancreatic cancer: understanding important variables in influencing the therapeutic index. *Semin Oncol* 2001;28:25-33.
- Curtis J, Harmon J, Ryan S: Stereotactic radiation therapy for the treatment of canine nasal tumors, *Vet Cancer Soc Proc* 2010;30:46.
- Denny HR, Gibbs C, Kelly DF. The surgical treatment of intra-nasal tumours in the dog. *Folia Vet Lat* 1975;5:527-548.
- Fossum TW *et al.* Chirurgia delle prime vie respiratorie. In: *Chirurgia dei piccoli animali*, Masson & Ed. Veterinarie, 2 ed, 2004.
- Fujiwara A, Kobayashi T, Kazato Y, Yayoshi N, Fujita M. Efficacy of hypofractionated radiotherapy for nasal

- tumours in 38 dogs (2005-2008). *J Small Anim Pract* 2013;54:80-86.
- Gieger T, Rassnick K, Siegel S, Proulx D, Bergman P, Anderson C, LaDue T, Smith A, Northrup N, Roberts R. Palliation of clinical signs in 48 dogs with nasal carcinomas treated with coarse-fraction radiation therapy. *J Am Anim Hosp Assoc* 2008;44:116-123.
- Glasser SA, Charney S, Dervisis NG, Witten MR, Ettinger S, Berg J, Joseph R. Use of an image-guided robotic radiosurgery system for the treatment of canine nonlymphomatous nasal tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 2014;50:96-104.
- Gutiérrez AN, Deveau M, Forrest LJ, Tomé WA, Mackie TR. Radiobiological and treatment planning study of a simultaneously integrated boost for canine nasal tumors using helical tomotherapy. *Vet Radiol Ultrasound* 2007;48:594-602.
- Hahn KA, Knapp DW, Richardson RC, Matlock CL. Clinical response of nasal adenocarcinoma to cisplatin chemotherapy in 11 dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:355-357.
- Hall EJ, Giaccia AJ. Time, dose, and fractionation in radiotherapy. In: *Radiobiology for radiologist*, Lippincott & Wilkins, 2011, Cap.23, pag: 391-400.
- Henry CJ, Brewer WG Jr, Tyler JW, Brawner WR, Henderson RA, Hankes GH, Royer N. Survival in dogs with nasal adenocarcinoma: 64 cases (1981-1995). *J Vet Intern Med* 1998;12:436-439.
- Hunley DW, Mauldin GN, Shiomitsu K, Mauldin GE. Clinical outcome in dogs with nasal tumors treated with intensity-modulated radiation therapy. *Can Vet J* 2010;51:293-300.
- LaDue TA, Dodge R, Page RL, Price GS, Hauck ML, Thrall DE. Factors influencing survival after radiotherapy of nasal tumors in 130 dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1999;40:312-317.
- Ladue T, Klein MK; Veterinary Radiation Therapy Oncology Group. Toxicity criteria of the veterinary radiation therapy oncology group. *Vet Radiol Ultrasound* 2001;42:475-476.
- Laing EJ, Binnington AG. Surgical therapy of canine nasal tumors: A retrospective study (1982-1986). *Can Vet J* 1988;29:809-813.
- Lana SE, Dernell WS, LaRue SM, Lafferty MJ, Douple EB, Brekke JH, Withrow SJ. Slow release cisplatin combined with radiation for the treatment of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 1997;38:474-478.
- Lana SE, Dernell WS, Lafferty MH, Withrow SJ, LaRue SM. Use of radiation and a slow-release cisplatin formulation for treatment of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2004;45:577-581.
- Langova V, Mutsaers AJ, Phillips B, Straw R. Treatment of eight dogs with nasal tumours with alternating doses of doxorubicin and carboplatin in conjunction with oral piroxicam. *Aust Vet J* 2004;82:676-680.
- Lawrence TS, Blackstock A, McGinn C. The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents. *Semin Rad Oncol* 2003;13:13-21

- Lawrence JA, Forrest LJ, Turek MM. Proof of principle of ocular sparing in dogs with sinonasal tumor treated with intensity-modulated radiation therapy, *Vet Radiol Ultrasound* 2010;51:561-570.
- LeBlanc AK, LaDue TA, Turrel JM, Klein MK. Unexpected toxicity following use of gemcitabine as a radiosensitizer in head and neck carcinomas: a veterinary radiation therapy oncology group pilot study. *Vet Radiol Ultrasound* 2004;45:466-470.
- Lucroy MD, Long KR, Blaik MA, Higbee RG, Ridgway TD. Photodynamic therapy for the treatment of intranasal tumors in 3 dogs and 1 cat. *J Vet Intern Med* 2003;17:727-729.
- MacEwen EG, Withrow SJ, Patnaik AK. Nasal tumors in the dog: retrospective evaluation of diagnosis, prognosis, and treatment. *J Am Vet Med Assoc* 1977;170:45-48.
- Madewell BR, Priester WA, Gillette EL, Snyder SP. Neoplasms of the nasal passages and paranasal sinuses in domesticated animals as reported by 13 veterinary colleges. *Am J Vet Res* 1976;37:851-856.
- Maruo T, Shida T, Fukuyama Y, Hosaka S, Noda M, Ito T, Sugiyama H, Ishikawa T, Madarame H. Retrospective study of canine nasal tumor treated with hypofractionated radiotherapy. *J Vet Med Sci* 2011;73:193-197.
- Mauldin GN, Meleo KA. Combination of carboplatin and radiotherapy for nasal tumors in dogs. *Proceedings Veterinary Cancer Society*, Townsend, TN 1995;129-130
- Mellanby RJ, Stevenson RK, Herrtage ME, White RA, Dobson JM. Long-term outcome of 56 dogs with nasal tumours treated with four doses of radiation at intervals of seven days. *Vet Rec* 2002;151:253-257.
- Morris JS, Dunn KJ, Dobson JM, White RAS. Effect of radiotherapy alone and surgery and radiotherapy on survival of dogs with nasal tumors. *J Small Anim Pract* 1994;35:567-573.
- Murphy SM, Lawrence JA, Schmiedt CW, Davis KW, Lee FT Jr, Forrest LJ, Bjorling DE. Image-guide transnasal cryoablation of a recurrent nasal adenocarcinoma in a dog. *J Small Animal Practice* 2011;52:329-333.
- Norris AM. Intranasal neoplasms in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1979;15:231-236.
- Northrup NC, Etue SM, Ruslander DM, Rassnick KM, Hutto DL, Bengtson A, Rand W, Moore AS. Retrospective study of orthovoltage radiation therapy for nasal tumors in 42 dogs. *J Vet Intern Med* 2001;15:183-189.
- Rassnick KM, Goldkamp CE, Erb HN, Scrivani PV, Njaa BL, Gieger TL, Turek MM, McNiel EA, Proulx DR, Chun R, Mauldin GE, Phillips BS, Kristal O. Evaluation of factors associated with survival in dogs with untreated nasal carcinomas: 139 cases (1993-2003). *J Am Vet Med Assoc* 2006;229:401-406.
- Sones E, Smith A, Schleis S, Brawner W, Almond G, Taylor K, Haney S, Wypij J, Keyerleber M, Arthur J, Hamilton T, Lawrence J, Gieger T, Sellon R, Wright Z. Survival times for canine intranasal sar-

comas treated with radiation therapy: 86 cases (1996-2011). *Vet Radiol Ultrasound* 2013;54:194-201.

Spruell JSA. Surgery of the nasal cavity of the dog. *Vet Rec* 1963;75:105-113.

Suntharalingam N, Podgorsak EB, Hendry JH. Basic radiobiology. In: *Radiation Oncology Physics: a handbook for teachers and students*. IAEA, 2005.

Tan-Coleman B, Lyons J, Lewis C, Rosenberg M, Ruiz A. Prospective evaluation of a 5×4 Gy prescription for palliation of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2013;54:89-92.

Thèon AP, Madewell BR, Harb MF, Dungworth DL. Megavoltage irradiation of neoplasms of the nasal and paranasal

cavities in 77 dogs. *J Am Med Assoc* 1993;202:1469-1475.

Thompson JP, Ackerman N, Bellah JR, Beale BS, Ellison GW. 192iridium brachytherapy, using an intracavitary afterload device, for treatment of intranasal neoplasms in dogs. *Am J Vet Res* 1992;53:617-622.

Thrall DE, Harvey CE. Radiotherapy of malignant nasal tumors in 21 dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1983;183:663-666.

Thrall DE, Mc Entee MC, Novotney C. A boost technique for irradiation of malignant canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 1993;34:295-300.

Withrow S.J. Cryosurgical therapy for nasal tumors in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982;18:585-589.

Parte sperimentale

Capitolo 4

Indagine retrospettiva

4.1 Introduzione

La prima parte di questo lavoro sperimentale ha come argomento uno studio retrospettivo su materiale di archivio finalizzato a un'indagine demografica sulle neoplasie nasali del cane.

4.2 Materiali e Metodi

L'indagine è stata effettuata includendo tutti i cani con lesioni nasali sottoposte ad esame istopatologico presso il Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (Università di Bologna) dal 2000 ad oggi o riferiti presso il Centro Oncologico Veterinario (Sasso Marconi). Sono state inoltre revisionate le cartelle cliniche di tutti i cani inclusi nello studio, con l'intento di raccogliere informazioni riguardanti i sintomi in presentazione, estensione locale della neoplasia primaria, presenza di metastasi regionali e a distanza e tipologia di trattamento effettuato.

4.3 Risultati

La ricerca ha permesso di raccogliere complessivamente 135 casi. In base alla diagnosi istologica erano presenti 14 casi di riniti croniche (10%), 15 lesioni simil-tumorali (polipi infiammatori, 11%), 2 neoplasie epiteliali benigne (2%), 67 neoplasie epiteliali maligne (50%), 3 neoplasie mesenchimali benigne (2%) e 34 tumori mesenchimali maligni (25%) (**Figura 4.1**). Nell'ambito dei tumori epiteliali erano presenti, in ordine di frequenza, adenocarcinoma ($n = 27$; 40%), carcinoma squamocellulare ($n = 13$; 19%), carcinoma a cellule di transizione ($n = 13$; 19%), carcinoma indifferenziato ($n = 7$; 11%), carcinoma adenosquamoso ($n = 2$; 3%), carcinoma adenoide cistico ($n = 2$; 3%), carcinoma neuroendocrino

($n = 2$; 3%) e carcinoma a cellule acinari ($n = 1$; 2%) (**Figura 4.2**). Tra le neoplasie mesenchimali, l'istotipo più frequente era il condrosarcoma ($n = 11$; 32%), seguito da sarcoma indifferenziato ($n = 10$; 29%), osteosarcoma ($n = 5$; 15%), emangiosarcoma ($n = 4$; 12%), mixosarcoma e fibrosarcoma ($n = 2$; 6% ciascuno) (**Figura 4.3**).

Considerando solo i tumori maligni, i cani affetti avevano un'età media di 10 anni ($\pm 2,8$ anni), 57 cani erano maschi (56%) e 44 erano femmine (43%). Il 45,5% dei pazienti ($n = 46$) erano meticci e, tra i cani di razza, i soggetti a morfotipo brachicefalo erano il 3% ($n = 3$) mentre la maggior parte (51,5%; $n = 52$) era a morfotipo dolico-mesocefalo. Le razze più rappresentate erano Setter ($n = 7$; 7%), Labrador Retriever ($n = 5$; 5%), Golden Retriever ($n = 4$; 4%) e Pastore Tedesco ($n = 3$; 3%).

In 53 casi è stato possibile avere informazioni in merito ai sintomi presenti al momento della diagnosi e allo stadio clinico. I segni clinici più frequenti, in ordine di frequenza, erano starnuti ($n = 45$; 85%), scolo nasale ($n = 40$; 75,5%), epistassi ($n = 31$; 58,5%), stertore respiratorio ($n = 18$; 34%), deformità facciale ($n = 14$; 28,5%), esoftalmo ($n = 5$; 9,4%) e sintomi nervosi ($n = 1$; 1,9%).

Cinque cani (9,4%) presentavano metastasi ai linfonodi regionali. In questi pazienti, i tumori diagnosticati erano carcinoma squamocellulare ($n = 1$), carcinoma neuroendocrino ($n = 1$), carcinoma a cellule di transizione ($n = 2$) e adenocarcinoma ($n = 1$). Un cane (1,8%) con una diagnosi di osteosarcoma presentava metastasi a distanza (polmone).

Dalla valutazione delle immagini TC, 16 cani (30,2%) mostravano uno sviluppo primario della neoplasia a livello di cavità nasale destra e 15 cani (28,3%) alla cavità sinistra. In 20 cani (37,7%) la neoplasia coinvolgeva entrambe le cavità nasali ed in 2 pazienti (3,8%) originava dal seno frontale.

Tutti questi cani sono stati sottoposti a trattamento radioterapico palliativo. L'intervallo libero da progressione mediano, valutato mediante esami TC e controlli clinici periodici è risultato di 236 giorni e la sopravvivenza mediana è stata di 442 giorni, senza differenze significative in merito alla tipologia neoplastica diagnosticata (tumori epiteliali o mesenchimali). I cani con metastasi regionali o a distanza presentavano intervallo libero da malattia e tempi di sopravvivenza significativamente più brevi ($P = 0,021$ e $P = 0,018$, rispettivamente).

La progressione locale della neoplasia è stata la principale causa di morte in questo gruppo di pazienti. Quarantasei cani (86,8%) sono deceduti o sono stati sottoposti ad eutanasia a causa della progressione del tumore primario, 4 (7,5%) a causa di metastasi a distanza (polmonari, epatiche, ossee) e 2 (3,8%) hanno presentato malattia progressiva localmente e a distanza. Tra le altre cause di morte sono state riportate emoaddome ($n = 1$), polmonite ab ingestis ($n = 1$) e collasso cardiocircolatorio per cause sconosciute ($n = 2$).

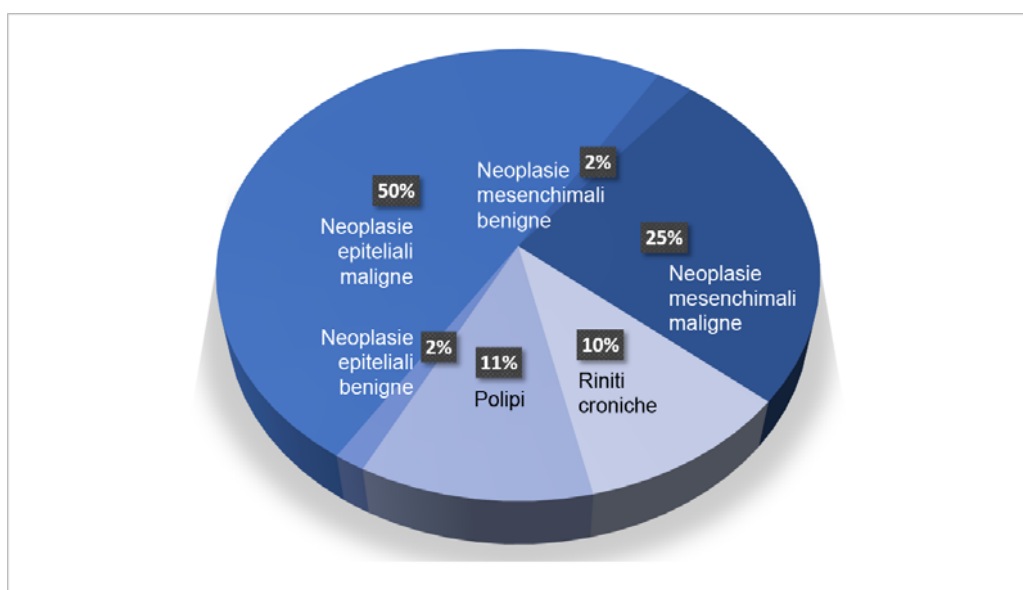


Figura 4.1 – Classificazione di 135 casi di biopsie nasali di cane in base alla diagnosi istologica.

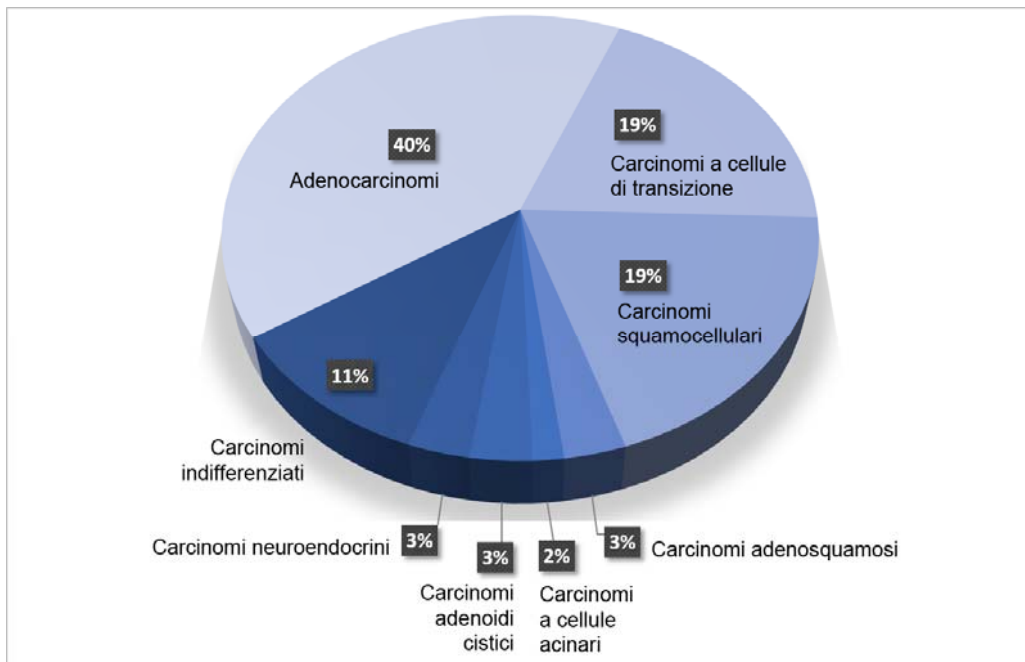


Figura 4.2 – Classificazione di 67 casi di tumori epiteliali maligni di cane in base alla diagnosi istologica.

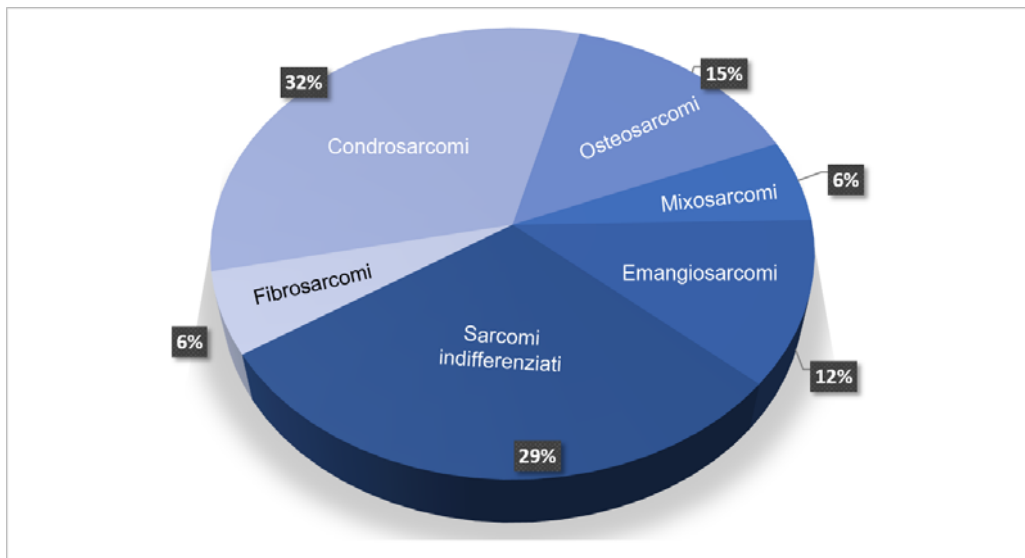


Figura 4.3 – Classificazione di 34 casi di tumori mesenchimali maligni di cane in base alla diagnosi istologica.

4.4 Discussione

I dati ottenuti da questa indagine retrospettiva in gran parte confermano i dati riportati in letteratura. In particolare, in letteratura è riportata una frequenza di neoplasie maligne nettamente superiore a quelle benigne. Le neoplasie maligne oscillano intorno all'80% e di queste circa il 60-75% è di origine epiteliale [Legendre *et al*, 1983; Patnaik *et al*, 1989]. Nei nostri pazienti le percentuali ottenute ricalcano quanto ottenuto in questi studi. Tra le neoplasie epiteliali l'adenocarcinoma si è confermato l'istotipo più comune e il condrosarcoma tra quelle mesenchimali.

Anche nei nostri casi, come riportato da alcuni autori [Hayes *et al*, 1982; Patnaik *et al*, 1989], vi è una lieve prevalenza dei cani maschi tre i pazienti affetti da neoplasie nasali maligne con età media intorno a 10 anni. Le razze maggiormente colpite risultano quelle meso-dolicomorfe e tra queste principalmente il Setter.

La sintomatologia clinica che accompagnava queste neoplasie rispecchia quanto riportato già 30 anni fa da Madewell *et al* (1976) e da Patnaik *et al* (1989) e, allora come oggi, la diagnosi è spesso tardiva a causa dell'aspecificità della sintomatologia prevalentemente costituita da starnuti, scolo nasale ed epistassi, riscontrati molto spesso in concomitanza di altre patologie respiratorie.

Il nostro studio conferma il basso tasso metastatico (9,4%) di queste neoplasie, a dimostrazione di quanto riportato in merito alla loro invasività e aggressività locale, che è risultata la principale causa di morte anche nella nostra indagine. La presenza di metastasi regionali e a distanza si conferma tuttavia un importante fattore prognostico negativo, come già in precedenza valutato in altri studi [Henry *et al*, 1998; La Due *et al*, 1999].

La radioterapia si dimostra un trattamento efficace per i tumori nasali. In questo studio sono stati inclusi solo pazienti sottoposti ad un protocollo radioterapico palliativo, conseguendo un tempo mediano libero da progressione neoplastica di 236 giorni e una sopravvivenza mediana di 442 giorni. I risultati ottenuti risultano superiori o equivalenti a quelli riportati in altri studi che hanno valutato l'efficacia della radioterapia nel trattamento dei tumori nasali del cane [Mellanby *et al*, 2002; Gieger *et al*, 2008; Buchholz *et al*, 2009; Tan-Coleman *et al*, 2013].

Bibliografia

- Buchholz J, Hagen R, Leo C, Ebling A, Roos M, Kaser-Hotz B, Bley CR. 3D conformal radiation therapy for palliative treatment of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2009;50:679-683.
- Gieger T, Rassnick K, Siegel S, Proulx D, Bergman P, Anderson C, LaDue T, Smith A, Northrup N, Roberts R. Palliation of clinical signs in 48 dogs with nasal carcinomas treated with coarse-fraction radiation therapy. *J Am Anim Hosp Assoc* 2008;44:116-123.
- Hayes HM, Wilson GP, Fraumeni HF. Carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses in dogs: descriptive epidemiology. *Cornell Vet* 1982;72:168-179.
- Henry CJ, Brewer WG, Tyler JJ, Brawnner WR, Henderson RA, Hankes GH, Royer N. Survival in dogs with nasal adenocarcinoma: 64 cases (1981-1995). *J Vet Intern Med* 1998;12:436-439.
- La Due T, Dodge R, Page RL, Price GS, Hauck ML, Thrall DE. Factors influencing survival after radiotherapy of nasal tumors in 130 dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1999;40:312-317.
- Legendre AM. Canine nasal and paranasal sinus tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983;19:115-123.
- Madewell BR, Priester WA, Gillette EL, Snyder SP. Neoplasms of the nasal passages and paranasal sinuses in domesticated animals as reported by 13 veterinary colleges. *Am J Vet Res* 1976;37:851-856.
- Mellanby RJ, Stevenson RK, Herrtage ME, White RA, Dobson JM. Long-term outcome of 56 dogs with nasal tumours treated with four doses of radiation at intervals of seven days. *Vet Rec* 2002;151:253-257.
- Patnaik AK. Canine sinonasal neoplasms: clinicopathological study of 285 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 1989;25:103-114.
- Tan-Coleman B, Lyons J, Lewis C, Rosenberg M, Ruiz A. Prospective evaluation of a 5 × 4 Gy prescription for palliation of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2013;54:89-92.

Capitolo 5

Indagine prospettica

5.1 Introduzione

I tumori nasali rappresentano meno del 2% di tutte le neoplasie canine diagnosticate [Medewell *et al*, 1976; Patnaik 1989]. I carcinomi costituiscono i due terzi dei tumori nasali del cane e sono caratterizzati da marcata invasività locale e da un basso tasso metastatico [Medewell *et al*, 1976; Legendre *et al*, 1983; Patnaik, 1989; La Due *et al*, 1999]. Per queste ragioni, chirurgia e chemioterapia, da sole, raramente portano ad un controllo del tumore a lungo termine. La radioterapia (RT) è il trattamento di scelta e ha permesso di raggiungere tempi di sopravvivenza mediani compresi tra gli 8 e i 23 mesi, mentre raramente si superano i 3 mesi nei pazienti che ricevono un trattamento medico palliativo [Adams *et al*, 1987; Thèon *et al*, 1993; Morris *et al*, 1994; Northrup *et al*, 2001; Mellanby *et al*, 2002; Gieger *et al*, 2008; Buchholz *et al*, 2009].

L'isoforma 2 della cicloossigenasi (COX-2) è un enzima inducibile, implicato nella crescita tumorale e nell'angiogenesi e nell'uomo sovraespresso in una varietà di condizioni neoplastiche [Belshaw *et al*, 2011]. In medicina veterinaria, COX-2 è stato riscontrato in diversi tumori epiteliali tra cui il carcinoma coloretale, il carcinoma prostatico, il carcinoma renale, i carcinomi squamocellulari orali e cutanei, il carcinoma mammario, il carcinoma a cellule di transizione e in altri tipi di tumore, tra cui il melanoma maligno e l'osteosarcoma [Tremblay *et al*, 1999; Khan *et al*, 2000; Khan *et al*, 2001; Pestili de Almeida *et al*, 2001; Knottenbelt *et al*, 2004; Mohammed *et al*, 2004; Millanta *et al*, 2012]. Nel carcinoma nasale, COX-2 è espresso nel 71-95% dei casi [Borzacchiello *et al*, 2004; Kleiter *et al*, 2004; Impellizzeri *et al*, 2008; Belshaw *et al*, 2011]. Considerando il potenziale ruolo di COX-2 nella progressione di questi tumori, sem-

bra razionale considerare che l'inibizione di COX-2 possa migliorare i risultati terapeutici nei pazienti affetti da queste neoplasie [Kleiter *et al*, 2004].

Firocoxib è un farmaco inibitore selettivo di COX-2 e in medicina veterinaria è utilizzato principalmente nel controllo del dolore chirurgico o in caso di osteoartrite [Pollmeier *et al*, 2006; Hanson *et al*, 2006; Lecoindre *et al*, 2010; Kondo *et al*, 2012]. Recentemente, questo farmaco è stato utilizzato con successo in cani con dermatite solare e lesioni epiteliali iperplastiche/displastiche con potenziale significato preneoplastico [Albanese *et al*, 2013]. Inoltre, uno studio ha dimostrato l'attività antitumorale del firocoxib in monoterapia o in associazione al cisplatino in cani con carcinoma a cellule di transizione della vescica [Knapp *et al*, 2013].

Lo scopo di questo studio è stato quello di confrontare l'efficacia e la tossicità della radioterapia utilizzata da sola o in combinazione con firocoxib nel trattamento del carcinoma nasale del cane. È stato ipotizzato che l'impiego di firocoxib possa aumentare l'attività antitumorale della radioterapia e fornire un beneficio clinico rispetto all'utilizzo del solo trattamento radioterapico.

5.2 Materiali e Metodi

Criteria d'inclusione

In questo studio prospettico, controllato, randomizzato in doppio cieco eseguito presso il Centro Oncologico Veterinario di Sasso Marconi (Bologna), sono stati reclutati cani con diagnosi istologica di carcinoma nasale. Sono stati esclusi pazienti con alterazioni della coagulazione, della funzionalità renale, cardiaca o epatica. Lo studio ha inoltre previsto l'esclusione di cani con metastasi a distanza alla presentazione e di quelli che in precedenza avevano ricevuto terapie anti-neoplastiche (chirurgia, chemioterapia o radioterapia) o farmaci anti-infiammatori non steroidei negli ultimi 6 mesi. Nel presente lavoro infine, sono stati inclusi solo cani che hanno ricevuto un trattamento palliativo a causa della neoplasia in stadio avanzato o per ragioni economiche/organizzative del proprietario.

Diagnosi e stadiazione

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a stadiazione completa, mediante esami ematici (emocromo, profilo biochimico, profilo coagulativo), esame delle urine, esame tomografico computerizzato (TC) total body e agoaspirato dei linfonodi mandibolari bilaterali.

Gli studi TC sono stati eseguiti utilizzando uno scanner multidetettore (GE Bright Speed, Milwaukee, WI, USA). Le immagini sono state acquisite dopo somministrazione endovenosa di 600 mg/kg di contrasto non-ionico (ioversolo, Optiray 300 mg/ml, Covidien SpA, Segrate) somministrato con un iniettore a 3 ml/sec. Sulla base dei reperti TC, i tumori sono stati stadiati secondo il sistema di classificazione di Adams modificato [Adams *et al*, 2009].

Diagnosi e stadiazione

Tutti i cani sono stati trattati utilizzando un acceleratore lineare 6 MV (Clinac DMX, Varian, Palo Alto, CA, USA). Per ciascun paziente, ai fini della pianificazione radioterapica, sono state eseguite scansioni TC con l'animale posizionato nella stessa maniera del successivo trattamento radioterapico (**Figura 5.1**). In particolare, i cani sono stati posizionati in decubito sternale all'interno di un dispositivo di posizionamento individuale costituito da un box in polimetilacrilato (Plexiglas), da un cuscino sgonfiabile (SecureVacTM, Bionix, Toledo, OH, USA) e da un calco dentale [Rohrer Bley *et al*, 2003]. I piani di trattamento individualizzati sono stati generati utilizzando un sistema di pianificazione 3D computerizzato (Eclipse versione 8.6, Varian) applicando l'algoritmo "pencil beam convolution" (versione 8.6.14). Il *gross tumor volume* (GTV) è stato definito nelle immagini TC come l'area tumorale macroscopicamente evidente in seguito alla presa di contrasto della lesione. Il *clinical target volume* (CTV) ha incluso il volume del tumore, entrambe le cavità nasali e il tessuto sottocutaneo considerato a rischio di eventuale malattia microscopica. Il *planning target volume* (PTV) è stato definito includendo un margine di 3-4 mm intorno al CTV, tenendo conto in questo modo di eventuali errori di posizionamento e/o movimenti fisiologici del paziente. Gli organi a rischio circostanti (occhi, cristallino e cervello) sono stati identificati utilizzando le immagini TC. Per la pianificazione del trattamento in materia di dose e volumi, sono state seguite le direttive

emanate nel report 50 e 62 dalla *International Commission on Radiation Units and Measurements* [ICRU report 50, 1993; ICRU report 62, 1999].

Piani di trattamento in 3D sono stati creati individualmente in maniera tale da distribuire la dose ai soli volumi bersaglio, al fine di ottenere la migliore distribuzione della dose e la copertura ottimale del tumore, escludendo per quanto possibile i tessuti normali. La dose è stata prescritta alla curva di isodose 95%. Variazioni di dose del 7,5% sono state considerate accettabili in accordo a quanto proposto nel report 50 dell'ICRU [ICRU report 50, 1993]. Un collimatore multilamellare costituito da 80 lamelle di piombo e cunei dinamici, entrambi posizionati nella testata della macchina (*gantry*) sono stati utilizzati al fine di modellare i campi di trattamento, includendo il volume tumorale e risparmiando i tessuti normali e gli organi a rischio circostanti e raggiungendo l'omogeneità della dose emanata all'interno del volume da irradiare. Quando indicato, al fine di distribuire in maniera uniforme la dose ai tessuti più superficiali, in sede di pianificazione è stato utilizzato un materiale, chiamato *bolus*, con densità molto simile a quella dell'acqua. Istogrammi dose-volume e ispezione visiva delle curve di isodose sono stati utilizzati per la valutazione del piano di trattamento. Il trattamento radioterapico ha previsto l'utilizzo di un protocollo di 5 frazioni x 6 Gy (dose totale di 30 Gy) effettuate due volte a settimana, o 10 frazioni x 3 Gy (dose totale di 30 Gy) effettuate quotidianamente, nei pazienti che presentavano estensione intracranica della neoplasia o coinvolgimento dell'orbita o del seno frontale. Nei pazienti con metastasi linfonodali, i linfonodi mandibolari sono stati irradiati alla stessa dose del tumore primario e utilizzando campi separati e non sovrapposti di elettroni, o sono stati inclusi nello stesso campo fottoni della neoplasia.

Il trattamento è stato somministrato in anestesia generale, indotta dalla somministrazione endovenosa di propofol (Propofol, Esteve, Abbott House, Berkshire, UK) e, dopo intubazione tracheale, mantenuta con isoflurano (ISOFLOR, Esteve, Abbott House) (1-3% in ossigeno).

I cani con carcinoma nasale sono stati randomizzati a ricevere firocoxib (Previcox, Merial SpA, Milano) (Gruppo 1), o un placebo (gruppo 2). Firocoxib è stato somministrato alla dose di 5 mg/kg/die. Per ciascun paziente, il dosaggio effettivo è stato adattato alla presentazione commerciale del farmaco (57 mg e 227 mg). Il placebo si presentava in formulazione identica a quella del firocoxib

e veniva fornito dalla stessa società farmaceutica. La somministrazione delle compresse iniziava 3-5 giorni prima della radioterapia e il trattamento veniva effettuato in maniera continuativa a vita. Né i proprietari né i medici veterinari impegnati nello studio erano a conoscenza del trattamento ricevuto dai cani.

Follow-up

Per tutta la durata dello studio, ai proprietari è stato chiesto di fornire regolarmente degli aggiornamenti in merito alla progressione degli effetti collaterali e alle condizioni cliniche generali dell'animale. Una valutazione da parte dei clinici è stata effettuata a 1 e 2 settimane dopo la fine della radioterapia, per valutare la remissione dei sintomi e gli effetti collaterali acuti dovuti alla radioterapia. Altre valutazioni cliniche ed esami TC total body sono stati programmati a 3, 6, 9 e 12 mesi o prima nel caso di comparsa di problemi di qualunque natura o in caso di sospetta recidiva.

La risposta oggettiva al trattamento è stata valutata mediante esame TC utilizzando gli *Standard Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* (RECIST) al fine di quantificare il risultato raggiunto [Nguyen *et al*, 2001]. Secondo queste linee guida, dopo un follow-up di 4-8 settimane, si definisce:

- remissione completa (*complete remission*, CR) la scomparsa di tutte le lesioni target;
- risposta parziale (*partial remission*, PR) la riduzione della somma dei diametri delle lesioni target di almeno il 30% rispetto al valore iniziale prima del trattamento;
- malattia stabile (*stable disease*, SD) una diminuzione inferiore al 30% o un aumento inferiore al 20% nella somma dei diametri delle lesioni target;
- malattia progressiva (*progressive disease*, PD) come aumento della somma dei diametri delle lesioni target di almeno il 20%, o lo sviluppo di nuove lesioni.

Queste risposte dovevano rimanere tali per almeno quattro settimane.

Gli effetti collaterali da radioterapia sono stati valutati durante l'esame clinico utilizzando un sistema di classificazione della tossicità standardizzato [*Acute Radiation Morbidity Scoring Scheme* (VRTOG)] [La Due *et al*, 2001] e dai proprietari a casa. L'eventuale tossicità correlata al firocoxib è stata valutata tramite controlli clinici ed esami ematici. In particolare, emocromo, esame bio-

chimico, esame della coagulazione (PT, APTT) e analisi delle urine sono state eseguite ogni due settimane durante la radioterapia, e successivamente ad ogni controllo programmato (3, 6, 9, 12 mesi) e per tutta la durata del trattamento. Ai proprietari dei cani è stato chiesto di completare mensilmente un questionario riguardante la qualità di vita dell'animale durante il trattamento (**Allegato I**). I parametri considerati sono stati: comportamento, attività, appetito e dolore. Per ogni categoria, è stato assegnato un punteggio da 1 a 3 a ciascuna risposta, dove 3 rappresenta il punteggio migliore.

Analisi statistica

Per tutti i cani, sono stati valutati l'intervallo libero da progressione e la sopravvivenza. L'intervallo libero da progressione è stato definito come l'intervallo (giorni) tra la prima frazione di radioterapia e la progressione della malattia, valutata in maniera oggettiva mediante esame TC o sulla base della sintomatologia clinica (es. secrezione nasale che non risponde al trattamento antibiotico, epistassi o grave congestione nasale). La sopravvivenza è stata calcolata come intervallo (giorni) tra la data della prima frazione di radioterapia e la data di morte. Eventuali differenze nell'intervallo libero da progressione e nella sopravvivenza tra il gruppo 1 e 2 sono state valutate effettuando un'analisi univariata (modello proporzionale di Cox). Altre variabili sono state testate ai fini prognostici, tra cui il sesso, l'età ($<$ o \geq valore mediano), il peso corporeo ($<$ o \geq valore mediano), i segni clinici alla presentazione, lo stadio tumorale, presenza di metastasi a carico dei linfonodi, l'istotipo e la tipologia di protocollo radioterapico utilizzato. Per esigenze statistiche, gli stadi 1-2 e 3-4 sono stati raggruppati, secondo quanto proposto nello studio originale da Adams *et al* (1998).

I vari istotipi sono stati raggruppati in base al loro comportamento biologico (adenocarcinomi e carcinomi a cellule di transizione hanno generalmente inferiore rispetto malignità con carcinomi a cellule squamose e carcinomi anaplastici).

Per ogni variabile, il rischio (*hazard ratio*, HR) di progressione della malattia o di morte dovuta alla neoplasia durante il periodo di studio è stato stimato con i corrispondenti intervalli di confidenza al 95% e valori di *P*.

Per l'analisi della sopravvivenza, i cani che sono morti a causa del carcinoma nasale sono stati registrati come eventi. I cani vivi al momento della chiusura

dello studio (dicembre 2013), persi al follow-up, o morti per cause non correlate al tumore sono stati censurati.

Le differenze nelle caratteristiche demografiche e tumorali tra il Gruppo 1 e il Gruppo 2 sono state valutate con test U di Mann-Whitney e il test esatto di Fisher. Il test U di Mann-Whitney è stato applicato anche per valutare i cambiamenti nei parametri ematici e urinari tra i valori basali e quelli ottenuti ai successivi controlli per ogni gruppo e per valutare la qualità di vita dei pazienti.

I dati sono stati analizzati utilizzando software commerciali (SPSS *Statistics* 19, IBM, Somers, NY, USA, e Prism 5.0, *GraphPad*, San Diego, CA, USA). Valori di $P \leq 0,05$ sono stati considerati significativi.

5.3 Risultati

Informazioni generali

Ventiquattro cani (9 maschi e 15 femmine) hanno soddisfatto i criteri di inclusione dello studio. L'età media al momento della diagnosi era di 9 anni (*range*, 5-15). Il peso variava da 6 a 40 kg (mediana, 20 kg). Dodici cani erano di razza pura e 12 erano meticci. Dei 24 pazienti reclutati, 12 sono stati inclusi in modo randomizzato nel gruppo firocoxib (Gruppo 1) e 12 nel gruppo placebo (Gruppo 2).

Dodici tumori (50%) erano adenocarcinomi. I restanti 12 erano carcinomi indifferenziati ($n = 5$; 20,8%), carcinomi squamocellulari ($n = 4$; 16,7%) e carcinomi a cellule di transizione ($n = 3$; 12,5%).

I segni clinici più comuni erano starnuti ($n = 19$; 79,2%), scolo nasale ($n = 17$; 70,8%), epistassi ($n = 14$; 58,3%) e deformità facciale ($n = 6$; 25%). Considerando il sistema di stadiazione di Adams modificato, cinque cani (20,8%) presentavano la neoplasia confinata ad una sola cavità nasale, ad un seno paranasale, o ad un seno frontale (stadio 1), cinque cani (20,8%) mostravano coinvolgimento osseo (stadio 2), tre cani (12,5%) avevano un coinvolgimento della cavità orbitale o presentavano invasione del tessuto sottocutaneo o sottomucoso (stadio 3). Infine, 11 cani (45,8%) presentavano lisi della lamina cribrosa o estensione della neoplasia a livello rinofaringeo (stadio 4). Nel Gruppo 1 erano presenti un cane in stadio 1, tre in stadio 2 e otto in stadio 4. Nel Gruppo 2, quattro cani erano in stadio 1, due erano in stadio 2, tre cani erano in stadio 3 e

3 in stadio 4. Due cani (8,3%, entrambi nel Gruppo 1) presentavano metastasi al linfonodo mandibolare ipsilaterale al momento della diagnosi.

Per quanto riguarda le caratteristiche demografiche e tumorali, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra Gruppo 1 e Gruppo 2 (**Tabella 5.1**).

Trattamento e tossicità

Diciotto cani (otto nel Gruppo 1 e 10 nel Gruppo 2) sono stati sottoposti ad un trattamento di 5 frazioni x 6 Gy. Gli altri sei pazienti (quattro nel Gruppo 1 e due nel Gruppo 2) hanno ricevuto un protocollo da 10 frazioni x 3 Gy. Nei due casi con metastasi, i linfonodi sono stati irradiati utilizzando un campo separato, non sovrapposto di elettroni (6 MeV) in un cane; nell'altro paziente invece, sono stati inclusi nello stesso campo fotoni.

Le dosi medie assorbite a livello di GTV, CTV e PTV sono state di 29,8 (*range*, 27,5-31,2 Gy), 29,7 (*range*, 26,5-31,2 Gy) e 29,3 Gy (*range*, 21,6-31,3 Gy), rispettivamente. La dose media assorbita a carico degli organi a rischio, tra cui gli occhi, cristallino e cervello è stata di 19,7 (*range*, 4,1-29,5 Gy), 15,3 (*range*, 4,1-21,6 Gy) e 7,8 Gy (*range*, 0-29,7 Gy), rispettivamente. Tutti i cani hanno completato il protocollo radioterapico prescritto senza interruzioni o sospensioni. Gli effetti collaterali acuti dovuti alla radioterapia sono comparsi durante l'ultima settimana di trattamento con progressivo peggioramento fino a 7-10 giorni dopo la fine del trattamento. Questi effetti acuti si sono manifestati principalmente a carico di cute e mucosa orale e risultavano completamente risolti tre settimane dopo il trattamento. Al loro picco, la tossicità acuta è stata lieve (grado 1 VRTOG) in 11 su 12 cani del gruppo di controllo e in tutti i cani del gruppo firocoxib e comprendeva dermatiti (10 nel Gruppo 1 e nove nel Gruppo 2), mucosite orale (sei casi per ciascun gruppo) e congiuntivite (tre nel Gruppo 1 e due nel Gruppo 2). In un cane nel gruppo placebo è stata diagnosticata dermatite e mucosite di grado 2. Tossicità tardiva di grado 1 VRTOG è stata documentata, ma non è stata associata a una diminuzione della qualità di vita. In particolare, nei cani sopravvissuti più di tre mesi dopo il trattamento radioterapico sono stati registrati nel campo irradiato leucotrichia (quattro nel Gruppo 1 e tre nel Gruppo 2), alopecia (una nel Gruppo 1 e due nel Gruppo 2) e iperpigmentazione cutanea (uno nel Gruppo 1 e due nel Gruppo 2). Inoltre, in due cani

del gruppo firocoxib è stata riscontrata la comparsa di cataratta asintomatica unilaterale 12 e 14 mesi dopo la fine della radioterapia, rispettivamente (**Figura 5.1**).

Gli esami clinici non hanno evidenziato anoressia, letargia, vomito, diarrea o debolezza durante lo studio. Il peso medio dei cani non ha presentato variazioni. Nessuna differenza di rilievo è stata registrata tra i valori basali e gli altri valori registrati in tempi successivi dell'emocromo e dei parametri urea, creatinina, GGT, ALT e ALP. In un solo cane è stato riscontrato un lieve aumento dei valori di creatinina (da 1,24 mg/dl a 1,89 mg/dl; *range*, 0-1,7) e urea (da 23 mg/dl a 72,8 mg/dl; *range* 10-40) dopo nove mesi di trattamento con firocoxib, ma senza nessun peggioramento nel successivo periodo di *follow-up* (13 mesi). Per quanto riguarda l'analisi delle urine, non vi era alcuna differenza all'interno e tra i due gruppi per quanto riguarda densità, pH e valori delle proteine urinarie durante tutto il periodo dello studio.

Risposta alla terapia e fattori prognostici

Una risoluzione completa dei segni clinici è stata osservata alla fine della radioterapia o subito dopo in 23 cani. Un solo cane del Gruppo 2 ha mostrato stertore persistente e starnuti durante e una volta completato il trattamento. Nove cani del Gruppo 1 sono stati sottoposti ad esame TC di controllo tre mesi dopo la fine della RT. In questi pazienti è stata riscontrata una remissione completa, quattro remissioni parziali, un caso di malattia stabile e tre di malattia progressiva. A sei mesi, l'esame TC è stato eseguito in quattro cani. Tre dei cani precedentemente in remissione parziale hanno presentato progressione di malattia ($n = 2$) o malattia stabile ($n = 1$). Un cane che mostrava remissione completa a tre mesi ha avuto progressione di malattia a sei mesi. I controlli TC a 9 e 12 mesi aggiuntivi sono stati eseguiti in due cani, mostrando rispettivamente una stabilizzazione e una progressione della malattia. Il cane con malattia stabile era ancora vivo alla fine dello studio.

Nel Gruppo 2, il controllo TC a tre mesi è stato eseguito in cinque cani. Tre di essi presentavano remissione parziale della lesione, uno era in remissione completa e un cane ha mostrato una progressione della malattia. Uno dei cani in remissione parziale ha subito un controllo TC a sei e nove mesi post-RT, mo-

strandando una stabilizzazione della malattia a sei mesi e malattia progressiva a nove mesi (**Figura 5.2**).

Per i pazienti non sottoposti a controlli TC, la risposta al trattamento è stata valutata clinicamente e determinata soggettivamente dai clinici e proprietari durante tutto il periodo di studio. In tutti i casi di recidiva o malattia progressiva è stato proposto un secondo trattamento radioterapico, che in tutti i casi è stato rifiutato dai proprietari. Nel Gruppo 1 non vi è stata sospensione della somministrazione di firocoxib anche in caso di malattia progressiva.

Quattro cani (due nel Gruppo 1 e due nel Gruppo 2) erano ancora vivi alla fine dello studio. Tre cani erano in stadio 4 e uno in stadio 3. Tre di loro avevano ricevuto un protocollo di 5x6 Gy, mentre uno era stato sottoposto a un protocollo di 10x3 Gy. Il *follow-up* mediano per questi cani è stato di 583 giorni (*range*, 338-797).

Venti cani sono morti a causa di una progressione della neoplasia primaria (10 nel Gruppo 1 e 10 nel Gruppo 2). L'intervallo mediano libero da progressione e la sopravvivenza mediana stimata sono stati di 229 e 332 giorni, rispettivamente. Considerando i gruppi di trattamento, l'intervallo libero da progressione mediana è stata di 228 giorni (*range*, 73-525) nel Gruppo 1 e 234 giorni (*range*, 50-475) nel Gruppo 2. La sopravvivenza mediana è stata di 335 giorni (*range*, 74-620) nel Gruppo 1 e 244 giorni (*range*, 85-505) nel Gruppo 2. Le differenze di intervallo libero da progressione e di sopravvivenza tra il Gruppo 1 e 2 non sono risultate statisticamente significative (**Tabella 5.2**). All'analisi univariata, il coinvolgimento metastatico dei linfonodi regionali è stato l'unico fattore di rischio significativamente associato all'intervallo libero da progressione (HR = 18,12; 95% CI = 2,5-131,18; $P = 0,004$) e alla sopravvivenza (HR = 34,89; 95% CI = 3,11-391,99; $P = 0,004$) (**Tabella 5.2**).

I risultati della qualità di vita ottenuti dai questionari sono riassunti nella **Tabella 5.3**. In generale, la qualità della vita era significativamente migliore nei cani del Gruppo 1 ($P = 0,008$). Considerando i singoli parametri, una differenza significativa è stata osservata riguardo all'attività ($P = 0,002$) e all'appetito ($P = 0,044$) (**Figura 5.3**).



Figura 5.1 – Esempi di effetti collaterali acuti e tardivi: dermatite (in alto a sinistra), mucosite (in alto a destra), iperpigmentazione cutanea (in basso a sinistra) e leucotrichia (in basso a destra).

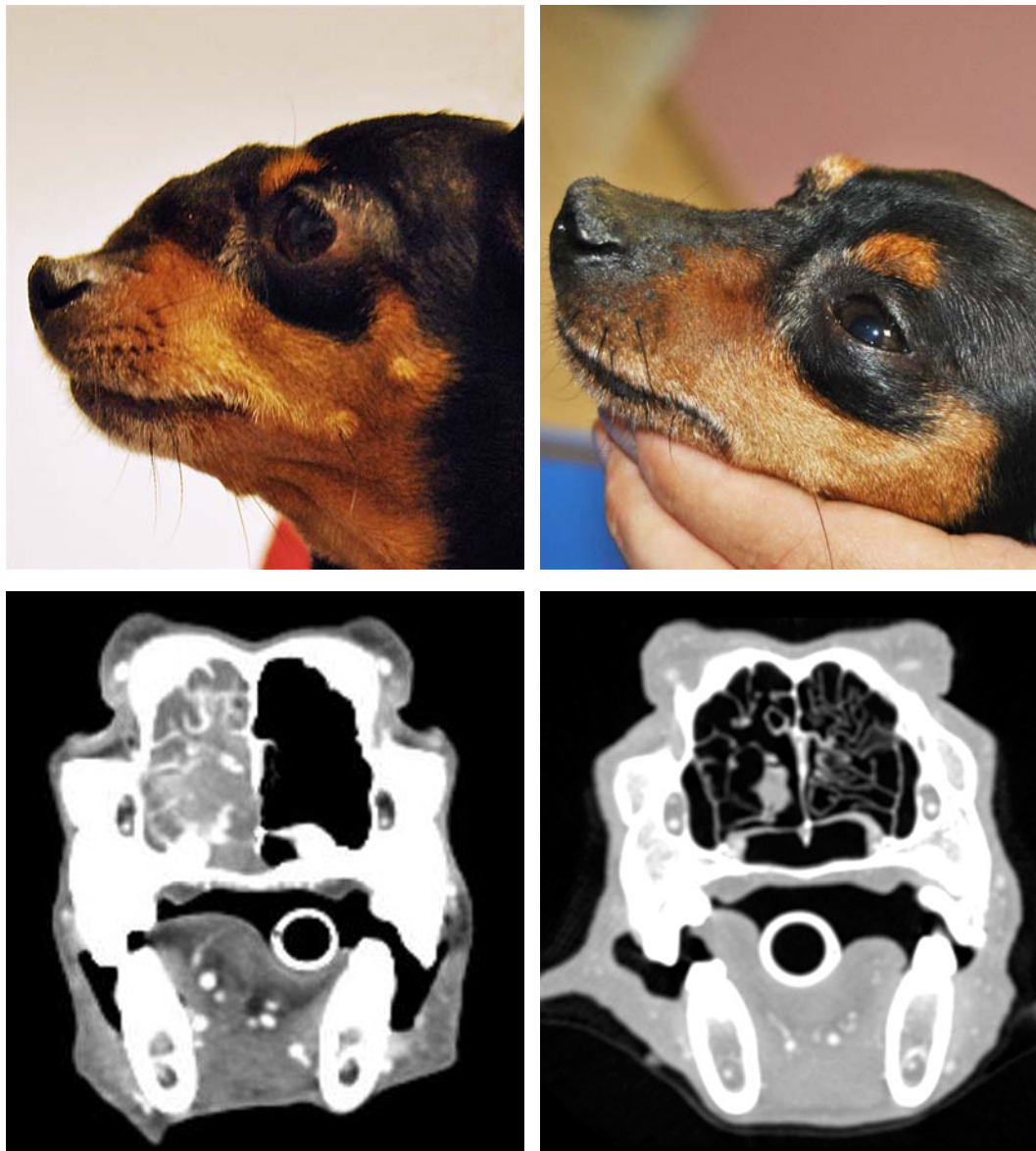


Figura 5.2 – In alto: cane con adenocarcinoma nasale. Evidente deformità facciale in presentazione (a sinistra) e risoluzione della stessa dopo trattamento radioterapico (a destra). In basso: immagine TC di una sezione trasversale delle cavità nasali di un cane con adenocarcinoma. Infiltrazione neoplastica della cavità nasale sinistra (a sinistra) e remissione parziale della lesione dopo trattamento radioterapico (a destra).

Tabella 5.1 – Caratteristiche demografiche e tumorali in 24 cani con carcinoma nasale suddivisi sulla base del trattamento ricevuto.

	Gruppo 1 (RT + firocoxib) <i>n</i> = 12	Gruppo 2 (RT + placebo) <i>n</i> = 12	<i>P</i>
Età mediana (<i>range</i>)	9 anni (6 – 15)	8,5 anni (5 – 12)	0,838
Sesso			0,089
<i>Maschio</i>	2	7	
<i>Femmina</i>	10	5	
Peso mediano (<i>range</i>)	22,5 kg (6 – 40)	20 kg (13 – 37)	0,931
Istotipo			0,499
<i>SCC e CA anaplastico</i>	5	4	
<i>ACA e TCC</i>	7	8	
Starnuti	9	10	0,999
Scolo nasale	8	9	0,999
Epistassi	7	7	0,999
Deformità facciale	3	3	0,999
Stadio			0,680
1-2	4	6	
3-4	8	6	
Metastasi linfonodali	2	0	0,478
Protocollo radioterapico			0,640
5x6 Gy	8	10	
10x3 Gy	4	2	

Tabella 5.2 – Variabili associate all’intervallo libero da progressione (PFI) e alla sopravvivenza (OS) in 24 cani con carcinoma nasale trattati con radioterapia e firocoxib.

	N° cani	PFI			OS		
		HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Età		0,75	0,32-1,81	0,528	0,73	0,3-1,8	0,496
≥ 9 anni	13						
< 9 anni	11						
Sesso		0,94	0,39-2,27	0,884	0,92	0,36-2,34	0,860
<i>maschio</i>	9						
<i>femmina</i>	15						
Peso		1,77	0,71-4,4	0,223	1,83	0,72-4,63	0,201
≥ 20 Kg	14						
< 20 Kg	10						
Istotipo		2,01	0,76-5,32	0,158	1,67	0,61-4,57	0,315
<i>SCC e CA anapl.</i>	9						
<i>ACA e TCC</i>	15						
Starnuti	19	0,66	0,24-1,84	0,429	0,55	0,19 – 1,54	0,251
Scolo nasale	17	0,76	0,28-2,07	0,592	0,95	0,33 – 2,74	0,919
Epistassi	14	0,83	0,35-1,99	0,674	0,78	0,32 – 1,88	0,571
Deformità facciale	6	1,89	0,7-5,13	0,211	1,42	0,48 – 4,15	0,526
Stadio		0,66	0,28-1,56	0,345	0,58	0,24-1,42	0,235
1-2	10						
3-4	14						
Metastasi linfonodali	2	27,29	2,4-309,6	0,004**	34,9	3,11-391,99	0,004**
Protocollo RT		2,00	0,74-5,46	0,174	1,63	0,56-4,79	0,373
5x6 Gy	18						
10x3 Gy	6						
Trattamento		0,65	0,26-1,65	0,367	0,60	0,3 – 1,56	0,196
<i>Gruppo 1</i>	12						
<i>Gruppo 2</i>	12						

Tabella 5.3 – Differenza media tra i punteggi ottenuti durante/dopo il trattamento e il punteggio ottenuto prima del trattamento in 24 cani con carcinoma nasale trattati con radioterapia (RT) e RT con firocoxib.

Parametri	RT + firocoxib Media ± SD	RT Media ± SD	P
Attività	0.6 ± 0.7	-0.1 ± 0.2	0.002**
Comportamento	0.6 ± 0.5	0.4 ± 0.4	0.311
Appetito	0.8 ± 0.8	0.2 ± 0.6	0.044*
Dolore	0.9 ± 0.7	0.7 ± 0.4	0.44
Totale	2.8 ± 1.6	1.3 ± 0.9	0.008**

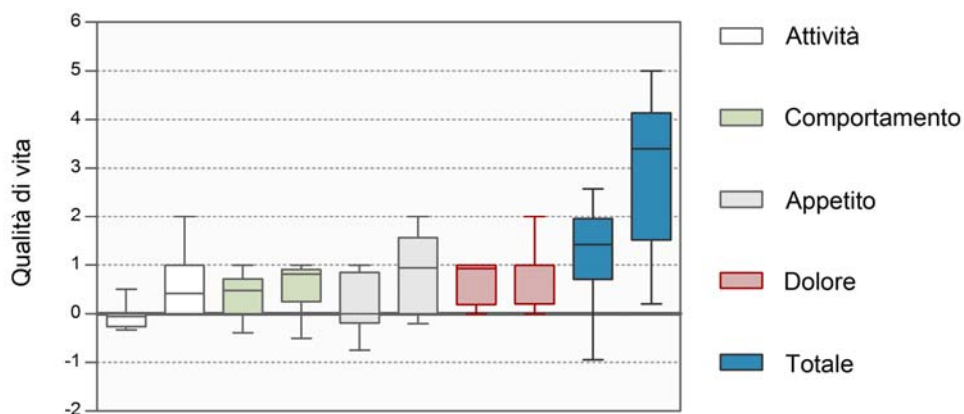


Figura 5.3 – Punteggio relativo alla qualità di vita in 24 cani con carcinoma nasale trattati con sola radioterapia (a sinistra) e radioterapia con firocoxib (a destra).

5.4 Discussione

Nei cani con tumori nasali è stata descritta una vasta serie di parametri con significato prognostico. I fattori associati alla sopravvivenza includono età <10 anni [LaDue *et al*,1999], coinvolgimento metastatico dei linfonodi regionali e a distanza (polmoni) al momento della diagnosi [Henry *et al*, 1998; La Due *et al*, 1999], presenza di deformità facciale e di epistassi [Northrup *et al*, 2001; Rasnick *et al*, 2006], durata dei segni clinici <90 giorni prima della diagnosi [Gieger *et al*, 2008], risoluzione dei segni clinici dopo il trattamento radioterapico [Northrup *et al*, 2001] e stadio tumorale [Adams *et al*, 1998; Mellanby *et al*, 2002]. In questo studio, la presenza di metastasi a carico dei linfonodi regionali si è rivelato l'unico fattore in grado di condizionare negativamente la sopravvivenza e l'intervallo libero da progressione. Sorprendentemente, nel nostro studio, lo stadio clinico non aveva alcuna rilevanza prognostica. Tuttavia, il ridotto numero di casi impedisce considerazioni definitive sulla prognosi.

Un altro limite di questo studio è la mancanza di uniformità nella valutazione della risposta alla terapia. Studi clinici ed esami TC sono stati programmati a 3, 6, 9 e 12 mesi dopo la RT; purtroppo, solo una parte dei proprietari ha accettato di effettuare in maniera regolare gli studi TC. In tutti gli altri casi, la risposta alla terapia è stata determinata soggettivamente mediante valutazione della sintomatologia clinica presentata dall'animale.

La radioterapia è diventata il trattamento d'elezione per i tumori nasali del cane; tuttavia, il protocollo più efficace, al fine di limitare gli effetti collaterali e massimizzare il risultato terapeutico, non è stato ancora identificato. Con i trattamenti radioterapici di tipo curativo, sono stati segnalati tempi di sopravvivenza mediani compresi tra i 12 e i 16 mesi [Thèon *et al*, 1993; Adams *et al*, 1998]. Questo tipo di approccio radioterapico può comportare effetti collaterali acuti da moderati a gravi, che in alcuni casi possono avere un impatto negativo sulla qualità di vita del paziente. In uno studio sono stati ottenuti tempi di sopravvivenza decisamente più lunghi abbinando questa tipologia di protocollo radioterapico ad una asportazione chirurgica della lesione nasale [Adams *et al*, 2005]. Tali risultati si affiancano però ad un tasso significativamente più alto di effetti collaterali tardivi, tra cui rinite cronica, osteomielite e osteonecrosi [Adams *et al*, 2005].

Nei cani con malattia avanzata è consigliato un approccio più conservativo, che prevede il ricorso a protocolli radioterapici ipofrazionati. Con questo regime, i tempi di sopravvivenza mediana riportati sono estremamente variabili e compresi tra 5 e 10,3 mesi [Gieger *et al*, 2008; Buchholz *et al*, 2009; Tan-Coleman *et al*, 2013].

Nel nostro studio, in tutti i pazienti è stato utilizzato un protocollo radioterapico palliativo. La maggior parte dei cani presentava uno stadio tumorale avanzato e per questi pazienti l'obiettivo è quello di alleviare i sintomi clinici, limitare gli effetti collaterali e mantenere una buona qualità di vita. Nove cani in stadio 1 e 2 sono stati trattati con RT ipofrazionata per ragioni economiche legate ai costi elevati di un trattamento curativo, per questioni organizzative, per le anestesi eccessive o per il rischio di tossicità associati a un trattamento definitivo.

L'intervallo libero da progressione e i tempi di sopravvivenza mediana raggiunti nei nostri pazienti sono paragonabili a quelli ottenuti in altri studi che hanno utilizzato un protocollo palliativo [Morris *et al*, 1994; Mellanby *et al*, 2002; Gieger *et al*, 2008; Buchholz *et al*, 2009]. Non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda lo stadio o la tipologia di protocollo utilizzato (5 o 10 frazioni). La RT è stata nel complesso ben tollerata con effetti collaterali acuti minimi, accettabili e ben gestibili in entrambi i gruppi. Gli effetti collaterali tardivi possono manifestarsi da mesi ad anni dopo il trattamento radioterapico. È generalmente accettato che l'uso di un regime ipofrazionato può aumentare l'incidenza di complicazioni tardive rispetto a un regime iperfrazionato [Fujiwara *et al*, 2013]. A causa della vicinanza degli occhi alla cavità nasale, le complicazioni oculari sono spesso descritte e, in medicina umana, è stato descritto che dosi superiori a 10-18 Gy a carico del cristallino, sono potenzialmente in grado di indurre cataratta [Hall *et al*, 2012]. Complessivamente, in questo studio, gli effetti collaterali tardivi sono risultati più bassi di quelli descritti in report analoghi [Gieger *et al*, 2008; Fujiwara *et al*, 2013]. Una cataratta unilaterale è stata osservata in due pazienti a 12 e 14 mesi dopo la fine della RT. In entrambi i casi, la neoplasia coinvolgeva il seno frontale e il rinofaringe; le dosi medie assorbite dal cristallino erano di 21.7 e 20.8 Gy, rispettivamente. Tuttavia, la cataratta non ha comportato problemi visivi (grado 1) e tale effetto collaterale è stato giudicato accettabile in pazienti con tumore in stadio avanzato che ricevono un trattamento palliativo. L'obiettivo principale di questo studio è stato

quello di valutare l'eventuale influenza di un inibitore della COX-2 (firocoxib) sulla risposta alla radioterapia dei carcinomi nasali.

Il sistema enzimatico COX comprende due isoforme, 1 e 2. Mentre la prima è persistentemente coinvolta nella gestione delle funzioni omeostatiche, COX-2 è indotta in risposta a stimoli infiammatori e recentemente è emerso il suo ruolo nello sviluppo e nella progressione neoplastica [Flory, 2005; Wang *et al*, 2011]. Dal momento che diversi tumori esprimono COX-2, la sua inibizione rappresenta un passo logico nell'approccio terapeutico multimodale [Flory, 2005]. La sovraespressione di COX-2 nei tumori nasali del cane è ben documentata [Borzacchiello *et al*, 2004; Kleiter *et al*, 2004; Impellizeri *et al*, 2008; Belshaw *et al*, 2011]. Tuttavia, l'inibizione di COX-2 a fini anti-neoplastici è stata documentata in pochi casi e limitatamente ad un farmaco non selettivo anti-COX (piroxicam) in associazione alla chemioterapia [Longova *et al*, 2004; de Vos *et al*, 2012]. Firocoxib inibisce selettivamente la sintesi di prostaglandine indotte da COX-2 e solitamente il suo utilizzo non si accompagna a un'elevata incidenza di effetti collaterali a livello renale e gastrointestinale che si osservano quando viene inibito l'enzima COX-1 [Flory, 2005].

In questo studio, gli eventuali effetti collaterali provocati da firocoxib sono stati testati per un periodo di tempo molto lungo (fino a 797 giorni). Nel complesso, il farmaco si è dimostrato sicuro e ben tollerato e, nonostante l'alta percentuale di pazienti geriatrici, non sono state osservate variazioni biochimiche di rilievo. L'insufficienza renale è un effetto collaterale comune in caso di utilizzo di farmaci anti-infiammatori non steroidei. In questo studio, la funzionalità renale è stata valutata misurando le concentrazioni di urea e creatinina sierica e mediante analisi delle urine; questi test sono facili da eseguire nella pratica clinica, anche se non sono nello specifico i test più sensibili per valutare le alterazioni della funzionalità renale [Raekallio *et al*, 2006]. In uno dei nostri pazienti, dopo otto mesi di trattamento, è stato osservato solo un leggero aumento dei valori di creatinina e urea, senza peggioramento nei successivi quattro mesi nonostante il proseguimento della terapia. Inoltre i parametri urinari non erano significativamente differenti rispetto a quelli iniziali. Tuttavia, per una migliore valutazione della funzionalità renale, la *glomerular filtration rate* è un esame fondamentale in grado di identificare in maniera più sensibile l'insufficienza renale, anche in fase iniziale [Raekallio *et al*, 2006].

La somministrazione di firocoxib non sembra migliorare l'efficacia della radioterapia, in quanto non sono state identificate differenze statisticamente significative nell'intervallo libero da progressione e nella sopravvivenza tra i due gruppi. Eventuali potenziali benefici indotti dall'utilizzo del firocoxib potrebbero essere stati tuttavia mascherati dal numero ridotto di casi e/o dalla prevalenza di pazienti in stadio avanzato.

Un risultato clinicamente rilevante è stato il significativo miglioramento della qualità della vita dei cani trattati con radioterapia combinata con firocoxib rispetto ai cani trattati solo con RT. In particolare, sulla base delle valutazioni eseguite dai proprietari, i pazienti sono stati sempre attivi, desiderosi di correre e giocare e, durante il periodo di trattamento, hanno mostrato un aumento dell'appetito. Tuttavia, l'aumento della mobilità in questi pazienti può essere correlato agli effetti del firocoxib nei confronti dell'osteoartrosi, che spesso si presenta nelle razze di taglia grande e in pazienti geriatrici, piuttosto che essere attribuito ad un vero e proprio effetto anti-tumorale [Lecoindre *et al*, 2010; Autefage *et al*, 2011]. Saranno necessari studi con un maggior numero di pazienti, con una suddivisione più omogenea per quanto riguarda lo stadio tumorale e con valutazione dell'espressione di COX-2 al fine di valutare l'effetto antitumorale di firocoxib sul carcinoma nasale canino.

Allegato 1 - Questionario utilizzato per valutare la qualità di vita in 24 cani con carcinoma nasale. I parametri indagati comprendono: comportamento (domande 1, 4 e 7), attività (domande 2 e 8), appetito (domanda 5) e dolore (domande 3 e 6). I punteggi assegnati a ciascuna risposta sono riportati tra parentesi.

Il cane interagisce con i membri della famiglia?

- (1) Totalmente indifferente
- (2) Interazione diminuita
- (3) Interazione invariata

Il cane è attivo?

- (1) Il mio cane sta fermo tutto il giorno
- (2) Il mio cane si muove occasionalmente
- (3) Il mio cane gioca e si muove normalmente

Come dorme il vostro cane?

- (1) Dorme male/Non dorme
- (2) In maniera intermittente
- (3) Normalmente

Il vostro cane ha mantenuto le sue abitudini igieniche (es. riesce a pulirsi)?

- (1) No
- (2) Meno di prima
- (3) Sì

Il vostro cane ha appetito?

- (1) No
- (2) Poco, devo stimolarlo/forzarlo
- (3) Normale

Il vostro cane vi permette di toccargli il naso?

- (1) Mai
- (2) Sì, ma è riluttante
- (3) Sempre

Com'è l'umore del vostro cane?

- (1) Alterato
- (2) Un po' depresso
- (3) Normale

Il vostro cane si stanca facilmente?

- (1) Sì, sempre
- (2) Spesso
- (3) No

Bibliografia

- Adams WM, Withrow SJ, Walshaw R, Turrell JM, Evans SM, Walker MA, Kurzman ID. Radiotherapy of malignant nasal tumors in 67 dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1987;191:311-315.
- Adams WM, Miller PE, Vail DM, Forrest LJ, MacEwen EG. An accelerated technique for irradiation of malignant canine nasal and paranasal sinus tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 1998;39:475-481.
- Adams WM, Bjorling DE, McAnulty JE, Green EM, Forrest LJ, Vail DM. Outcome of accelerated radiotherapy alone or accelerated radiotherapy followed by exenteration of the nasal cavity in dogs with intranasal neoplasia: 53 cases (1990-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2005;227:936-941.
- Adams WM, Kleiter MM, Thrall DE, Klauer JM, Forrest LJ, La Due TA, Havighurst TC. Prognostic significance of tumor histology and computed tomographic staging for radiation treatment response of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2009;50:330-335.
- Albanese F, Abramo F, Caporali C, Vichi G, Millanta F. Clinical outcome and cyclo-oxygenase-2 expression in five dogs with solar dermatitis/actinic keratosis treated with firocoxib. *Vet Dermatol* 2013;24:606-e147.
- Autefage A, Palissier FM, Asimus E, Pepin-Richard C. Long-term efficacy and safety of firocoxib in the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec* 2011;168:617
- Belshaw Z, Constantio-Casas F, Brearley MJ, Dunning MD, Holmes MA, Dobson JM. COX-2 expression and outcome in canine nasal carcinomas treated with hypofractionated radiotherapy. *Vet Comp Oncol* 2011;9:141-148.
- Borzacchiello G, Paciello O, Papparella S. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in canine nasal carcinomas. *J Comp Pathol* 2004;131:70-76.
- Buchholz J, Hagen R, Leo C, Ebling A, Roos M, Kaser-Hotz B, Bley CR. 3D conformal radiation therapy for palliative treatment of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2009;50:679-683.
- de Vos J, Ramos Vega S, Noorman E, de Vos. Primary frontal sinus squamous cell carcinoma in three dogs treated with piroxicam combined with carboplatin or toceranib. *Vet Comp Oncol* 2012;10:206-213.
- Flory AB, LeBlanc AK. The role of cyclooxygenase in carcinogenesis and anti-cancer therapy. *Compendium* 2005.

- Fujiwara A, Kobayashi T, Kazato Y, Yayoshi N, Fujita M. Efficacy of hypofractionated radiotherapy for nasal tumours in 38 dogs (2005-2008). *J Small Anim Pract* 2013;54:80-86.
- Gieger T, Rassnick K, Siegel S, Proulx D, Bergman P, Anderson C, LaDue T, Smith A, Northrup N, Roberts R. Palliation of clinical signs in 48 dogs with nasal carcinomas treated with coarse-fraction radiation therapy. *J Am Anim Hosp Assoc* 2008;44:116-123.
- Hall EJ, Giaccia AJ. In: *Radiobiology for the Radiologist*, 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2012; 350.
- Hanson PD, Brooks KC, Case J, Conzemius M, Gordon W, Schuessler J, et al. Efficacy and safety of firocoxib in the management of canine osteoarthritis under field conditions. *Veterinary Therapeutics* 2006;7:127-140.
- Henry CJ, Brewer WG, Tyler JJ, Brawnner WR, Henderson RA, Hanks GH, Royer N. Survival in dogs with nasal adenocarcinoma: 64 cases (1981-1995). *J Vet Intern Med* 1998;12:436-439.
- Impellizeri JA, Esplin DG. Expression of cyclooxygenase-2 in canine nasal carcinoma. *Vet J* 2008;176:408-410.
- International Commission of Radiation Units and Measurements. Prescribing, recording, and reporting photon beam therapy, ICRU report 50. Bethesda, MD: ICRU, 1993.
- International Commission of Radiation Units and Measurements. Prescribing, recording, and reporting photon beam therapy (Supplement to ICRU Report 50), ICRU report 62. Bethesda, MD: ICRU, 1999.
- Khan KN, Knapp DW, DeNicola DB, Harris RK. Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am J Vet Res* 2000;61:478-81.
- Khan KN, Stanfield KM, Trajkovic D, Knapp DW. Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol* 2001;38:116-119.
- Kleiter MK, Malarkey DE, Ruslander DE, Thrall DE. Expression of cyclooxygenase-2 in canine epithelial nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2004;45:255-260.
- Knapp DW, Henry CJ, Widmer WR, Tan KM, Moore GE, Ramos-Vara JA, et al. Randomized Trial of Cisplatin versus Firocoxib versus Cisplatin/Firocoxib in Dogs with Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. *J Vet Intern Med* 2013;27:126-133.
- Knottenbelt CM, Simpson JW, Tasker S, Ridyard AE, Chandler ML, Jamieson PM, et al. Preliminary clinical observations on

- the use of piroxicam in the management of rectal tubulopapillary polyps. *J Small Anim Pract* 2000;41(9):393-397.
- Kondo Y, Takashima K, Matsumoto S, et al. Efficacy and safety of firocoxib for the treatment of pain associated with soft tissue surgery in dogs under field conditions in Japan. *J Vet Med Sci* 2012;74(10):1283-1289.
- LaDue T, Dodge R, Page RL, Price GS, Hauck ML, Thrall DE. Factors influencing survival after radiotherapy of nasal tumors in 130 dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1999;40:312-317.
- LaDue T, Klein MK. Toxicity criteria of the veterinary radiation therapy oncology group. *Vet Radiol Ultrasound* 2001;42:475-476.
- Lecoindre O, Pepin-Richard C. Tolerance of firocoxib in dogs with osteoarthritis during 90 days. *J Vet Pharmacol Therap* 2010;34:190-192.
- Legendre AM. Canine nasal and paranasal sinus tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983;19:115-123.
- Longova V, Mutsaers AJ, Philips B, Straw R. Treatment of eight dogs with nasal tumours with alternating doses of doxorubicin and carboplatin in conjunction with oral piroxicam. *Aust Vet J* 2004;82:676-680.
- Medewell BR, Priester WA, Gillette EL, Snyder SP. Neoplasms of the nasal passages and paranasal sinuses in domesticated animals as reported by 13 veterinary colleges. *Am J Vet Res* 1976;37:851-856.
- Mellanby RJ, Stevenson RK, Herrtage ME, White RA, Dobson JM. Long-term outcome of 56 dogs with nasal tumours treated with four doses of radiation at intervals of seven days. *Vet Rec* 2002;151:253-257.
- Millanta F, Asproni P, Cancedda S, Vignoli M, Bacci B, Poli A. Immunohistochemical Expression of COX-2, mPGES and EP2 Receptor in Normal and Reactive Canine Bone and in Canine Osteosarcoma. *J Comp Path* 2012;147:153-160.
- Mohammed SI, Khan KN, Sellers RS, Hayek MG, DeNicola DB, Wu L, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70:479-483.
- Morris JS, Dunn KJ, Dobson JM, White RAS. Effect of radiotherapy alone and surgery and radiotherapy on survival of dogs with nasal tumors. *J Small Anim Pract* 1994;35:567-573.
- Nguyen SM, Thamm DH, Vail DM, London CA. Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol* 2013; doi: 10.1111/vco.12032.

- Northrup NC, Etue SM, Ruslander DM, Rassnick KM, Hutto DL, Bengtson A, Rand W, Moore AS. Retrospective study of orthovoltage radiation therapy for nasal tumors in 42 dogs. *J Vet Intern Med* 2001;15:183-189.
- Patnaik AK. Canine sinonasal neoplasms: clinicopathological study of 285 cases. *J Vet Intern Med* 1989;25:103-114.
- Pestili de Almeida EM, Piche C, Sirois J, Dore M. Expression of cyclo-oxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J Histochem Cytochem* 2001;49:867-875.
- Pollmeier M, Toulemonde C, Fleishman C, Hanson PD. Clinical Evaluation of firocoxib and carprofen for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec* 2006;159:547-551.
- Raekallio MR, Hielm-Björkman AK, Kejonen J, Salonen HM, Sankari SM. Evaluation of adverse effects of long-term orally administered carprofen in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2006;228:876-880.
- Rassnick KM, Goldkamp CE, Erb HN, Scrivani PV, Njaa BL, Gieger TL, Turek MM, McNiel EA, Proulx DR, Chun R, Mauldin GE, Phillips BS, Kristal O. Evaluation of factors associated with survival in dogs with untreated nasal carcinomas: 139 cases (1993-2003). *J Am Vet Med Assoc* 2006;229:401-406.
- Rohrer Bley C, Blattmann H, Roos M, Sumova A, Kaser-Hotz B. Assessment of a radiotherapy patient immobilization device using single plane port radiographs and a remote computed tomography scanner. *Vet Radiol Ultrasound* 2003;44:470-475.
- Tan-Coleman B, Lyons J, Lewis C, Rosenberg M, Ruiz A. Prospective evaluation of a 5×4 Gy prescription for palliation of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2013;54:89-92.
- Thèon A.P., Madewell B.R., Harb M.F., Dungworth D.L. Megavoltage irradiation of neoplasms of the nasal and paranasal cavities in 77 dogs. *J Am Med Assoc* 1993;202:1469-1475.
- Tremblay C, Dore M, Bochsler PN, Sirois J. Induction of prostaglandin G/H synthase -2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1398-1403.
- Wang X, Baek SJ, Eling T. COX inhibitors directly alter gene expression: role in cancer prevention?. *Cancer Metastasis Rev* 2011;30:641-657.

Capitolo 6

Indagine immunoistochimica

6.1 Introduzione

A integrazione dello studio descritto nel capitolo precedente, è stata effettuata un'analisi immunoistochimica allo scopo di valutare, nei carcinomi nasali del cane, l'espressione di *marker* legati alla trasformazione neoplastica o alla progressione tumorale (COX-2, EGFR, VEGF) e all'attività proliferativa (Ki67/MIB-1). L'indagine è volta ad individuare criteri immunoistochimici potenzialmente utili a definire la prognosi, valutare preventivamente l'efficacia del trattamento radioterapico e indicare l'opportunità di ricorrere a trattamenti farmacologici mirati.

6.2 Materiali e Metodi

Per tutti i pazienti inclusi nello studio prospettico descritto nel **Capitolo 5**, sono stati richiesti ai patologi di riferimento i campioni bioptici di tessuto tumorale utilizzati per la formulazione della diagnosi istologica. Il materiale, fissato in formalina e incluso in paraffina, è stato utilizzato per valutare l'espressione immunoistochimica di COX-2, EGFR, VEGF e Ki67 mediante anticorpi commerciali attivi verso antigeni umani la cui cross-reattività nel cane è stata dimostrata in studi precedenti [Shiomitsu *et al*, 2009; Millanta *et al*, 2010; Millanta *et al*, 2012]. Le caratteristiche del pannello immunoistochimico e i sistemi di rivelazione utilizzati sono descritti nella **Tabella 6.1**. L'analisi immunoistochimica è stata effettuata mediante tecnica streptavidina-biotina-perossidasi. Come cromogeno è stata impiegata la diaminobenzidina. Per valutare la specificità della reazione sono stati utilizzati appropriati controlli positivi e negativi.

I criteri impiegati per la valutazione immunoistochimica di COX-2, EGFR e VEGF ricalcano quelli utilizzati in precedenti studi sui tumori nasali del cane e

mirano ad integrare i riscontri relativi all'intensità della positività e alla frazione di cellule positive (**Tabella 6.2**) [Shiomitsu *et al*, 2009; Belshaw *et al*, 2010].

L'attività proliferativa è stata valutata quantificando con un programma semiautomatico di analisi d'immagine (Nikon LUCIA, *Laboratory Imaging Ltd.*) la percentuale media di nuclei positivi all'anticorpo MIB-1 sul totale delle cellule neoplastiche valutate in 5 campi a forte ingrandimento 400x, scelti nelle aree a maggiore attività proliferativa (*Ki67-index*). I risultati delle valutazioni immunostochimiche sono stati correlati tra loro e con i dati relativi a istotipo e stadio clinico mediante test esatto di Fisher. I dati sono stati analizzati utilizzando software commerciali (SPSS *Statistics* 19, IBM, Somers, NY, USA e Prism 5.0, *GraphPad*, San Diego, CA, USA). Valori di $P \leq 0,05$ sono stati considerati significativi.

Tabella 5.1 – Pannello immunostochimico e sistemi di rivelazione utilizzati su una casistica di carcinomi delle cavità nasali di cane.

Anticorpo primario	Caratteristiche	Diluizione d'uso	Sistema di rivelazione
COX-2	Anticorpo monoclonale di capra (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)	1:50	Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
EGFR	Anticorpo monoclonale di topo (Clone 111.6 Neomarkes, CA, USA)	1:100	Envision (Dako)
VEGF	Anticorpo policlonale di coniglio (Clone A-20; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)	1:200	Envision (Dako)
MIB-1	anticorpo monoclonale di topo (Dako Glostrup, Danimarca)	1:30	LSAB (Dako)

Tabella 5.2 – Criteri impiegati per la valutazione immunohistochimica di COX-2, EGFR, VEGF e Ki67 in campioni istologici di carcinoma nasale di cane.

Marker immunohistochimici	Criteri di valutazione												
COX-2	<p>(Score proposto da Belshaw <i>et al</i>, 2010)</p> <p>Localizzazione: membranosa/citoplasmatica/nucleare</p> <table> <tr> <td>Intensità (valutata sull'intera sezione a 200x)*</td> <td>Frazione di cellule positive (media in 5 campi a 400x)*</td> </tr> <tr> <td>1: lieve</td> <td>1: <1%</td> </tr> <tr> <td>2: moderata</td> <td>2: 1-9%</td> </tr> <tr> <td>3: elevata</td> <td>3: 10-50%</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4: >50%</td> </tr> </table> <p>Score complessivo: prodotto di intensità e frazione di cellule positive.</p> <p>Positività: score complessivo ≥ 2</p> <p><i>*valutati solo campi con più del 50% di cellule tumorali, evitando aree necrotiche o ricche di cellule di infiammatorie.</i></p>	Intensità (valutata sull'intera sezione a 200x)*	Frazione di cellule positive (media in 5 campi a 400x)*	1: lieve	1: <1%	2: moderata	2: 1-9%	3: elevata	3: 10-50%		4: >50%		
Intensità (valutata sull'intera sezione a 200x)*	Frazione di cellule positive (media in 5 campi a 400x)*												
1: lieve	1: <1%												
2: moderata	2: 1-9%												
3: elevata	3: 10-50%												
	4: >50%												
EGFR, VEGF	<p>(Score proposto da Shiomitsu <i>et al</i>, 2009)</p> <p>Localizzazione: membranosa/citoplasmatica/nucleare</p> <table> <tr> <td>Intensità</td> <td>Frazione di cellule positive</td> </tr> <tr> <td>1: lieve</td> <td>0: 0%</td> </tr> <tr> <td>2: moderata</td> <td>1: <10%</td> </tr> <tr> <td>3: elevata</td> <td>2: 10-30%</td> </tr> <tr> <td></td> <td>3: 31-60%</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4: >60%</td> </tr> </table> <p>Score complessivo: prodotto di intensità e frazione di cellule positive.</p> <p>Positività: score complessivo ≥ 2</p>	Intensità	Frazione di cellule positive	1: lieve	0: 0%	2: moderata	1: <10%	3: elevata	2: 10-30%		3: 31-60%		4: >60%
Intensità	Frazione di cellule positive												
1: lieve	0: 0%												
2: moderata	1: <10%												
3: elevata	2: 10-30%												
	3: 31-60%												
	4: >60%												
Attività proliferativa (MIB-1/Ki67)	<p>Ki67-index – percentuale media di nuclei di cellule neoplastiche positivi, valutati in 5 campi a forte ingrandimento (400x) in analisi d'immagine.</p>												

6.3 Risultati

L'immunopositività rilevata è stata citoplasmatica per COX-2 e VEGF, di membrana per EGFR e nucleare per Ki67 (**Figura 6.1**). L'espressione di COX-2 è stata valutata in 14 casi, 5 dei quali (36%) sono risultati positivi, con uno score mediano di 2 (*range*, 2-6). EGFR è risultato espresso in 11 di 13 casi valutati (85%), con uno score mediano di 8 (*range*, 2-12). VEGF era espresso in 5 di 12 casi (67%), con uno score mediano di 4 (*range*, 2-8). Il *Ki67-index* mediano è risultato del 19.29% (*range*, 2-88,9%). Non sono state identificate correlazioni statisticamente significative tra espressione di questi marker e istotipo tumorale o stadio clinico. Dato il ridotto numero di casi non è stato possibile stabilire un'associazione tra positività immunohistochimica e risposta alla terapia.

6.4 Discussione

La percentuale di carcinomi nasali COX-2 positivi osservata in questo studio (36%) risulta nettamente inferiore rispetto a quanto riportato in studi precedenti (71-95%) [Borzacchiello *et al*, 2004; Kleiter *et al*, 2004; Impellizeri *et al*, 2008; Belshaw *et al*, 2011]. Questo potrebbe in parte giustificare la scarsa risposta al trattamento con firocoxib ottenuta nei nostri pazienti. In alternativa, i limitati effetti dell'inibizione di COX-2 potrebbero dipendere dalla scarsa influenza di COX-2 sul comportamento biologico dei carcinomi nasali canini. Uno studio recente, infatti, non ha evidenziato alcuna correlazione tra l'espressione immunohistochimica di COX-2 e la sopravvivenza [Belshaw *et al*, 2011]. Nel nostro studio, tuttavia, la valutazione dell'espressione di COX-2 in un numero limitato di casi non permette di formulare ipotesi sul ruolo prognostico di questo marker. Nelle cellule tumorali resistenti alle radiazioni ionizzanti è stata riscontrata una sovraespressione di EGFR, suggerendo che la sua disregolazione possa rappresentare un importante meccanismo di attenuazione degli effetti citotossici provocati dalla radioterapia [Thariat *et al*, 2007]. Nell'unico studio che ha valutato l'espressione di EGFR nei carcinomi nasali del cane, è stata evidenziata una positività nel 54% dei casi. [Shiomitsu *et al*, 2009]. Nel nostro studio, l'espressione di EGFR è risultata decisamente superiore (85%). Questo può suggerire l'utilità di terapie anti-EGFR allo scopo di potenziare gli effetti della radioterapia.

Anche un basso indice di proliferazione tumorale è stato correlato ad una scarsa risposta al trattamento radioterapico. I tumori maligni proprio perché caratterizzati da una crescita rapida possono presentare regioni meno ossigenate (ipossiche) rispetto ai tessuti normali. In ambiente ipossico le cellule sono prevalentemente in fase G0 e possono pertanto risultare più radioresistenti [Kennedy *et al*, 1997]. A conferma di questo, nei gatti con carcinoma squamocellulare trattati con radioterapia, un elevato Ki67-index è risultato associato ad un prolungamento dell'intervallo libero da malattia [Melzer *et al*, 2006]. Nel carcinoma nasale del cane non sono state finora identificate differenze nell'espressione di Ki67 tra i pazienti che hanno o meno ottenuto una buona risposta alla radioterapia [Fu *et al*, 2014]. Anche per questo marker il numero di casi esaminati non è purtroppo sufficiente per trarre conclusioni attendibili. La maggior parte dei cani per cui era disponibile il follow-up e trattati con radioterapia erano stati infatti riferiti da altre strutture con una precedente diagnosi istologica, e in un cospicuo numero di questi non è stato possibile recuperare l'incluso in paraffina da cui allestire nuove sezioni istologiche per le determinazioni immunoistochimiche. L'incremento della casistica mediante la richiesta sistematica di campioni tissutali al momento della prima visita potrà senza dubbio contribuire a chiarire se questi marker possono effettivamente fornire indicazioni utili a prevedere l'efficacia del trattamento radioterapico.

Tabella 6.3 – Parametri istologici e immunoistochimici valutati in 15 casi di carcinoma delle cavità nasali di cane.

N°	Età	Razza	Sesso	Diagnosi	COX-2 score	EGFR score	VEGF score	MIB-1/ Ki67-index
1	7	Meticcio media taglia	F	Adenocarcinoma tubulo-papillare	2	6	2	14,23%
2	5	Border Collie	M	Carcinoma indifferenziato	1	0	0	23,72%
3	15	Meticcio grossa taglia	F	Adenocarcinoma acinare	1	NA	1	NA
4	10	Meticcio media taglia	F	Adenocarcinoma tubulo-papillare	1	8	NA	88,90%
5	9	Setter inglese	M	Carcinoma indifferenziato	1	3	4	31,01%
6	7	Meticcio media taglia	F	Carcinoma adenosquamoso	0	8	1	14,86%
7	9	Collie	M	Adenocarcinoma papillare	0	12	2	14,41%
8	7	Labrador retriever	F	Carcinoma neuroendocrino	2	8	1	38,22%
9	12	Barboncino toy	F	Adenocarcinoma tubulo-papillare	2	8	0	2,00%
10	8	Border Collie	F	Adenocarcinoma tubulo-papillare	0	NA	0	NA
11	7	Meticcio media taglia	F	Adenocarcinoma tubulo-papillare	NA	12	NA	NA
12	8	Lagotto romagnolo	F	Carcinoma a cel- lule di transizione	6	0	0	23,95%
13	12	Meticcio media taglia	M	Adenocarcinoma solido	0	2	8	9,36%
14	10	Bolognese	F	Adenocarcinoma papillare	3	6	6	11,87%
15	6	Meticcio media taglia	M	Carcinoma squamocellulare	1	3	NA	36,70%

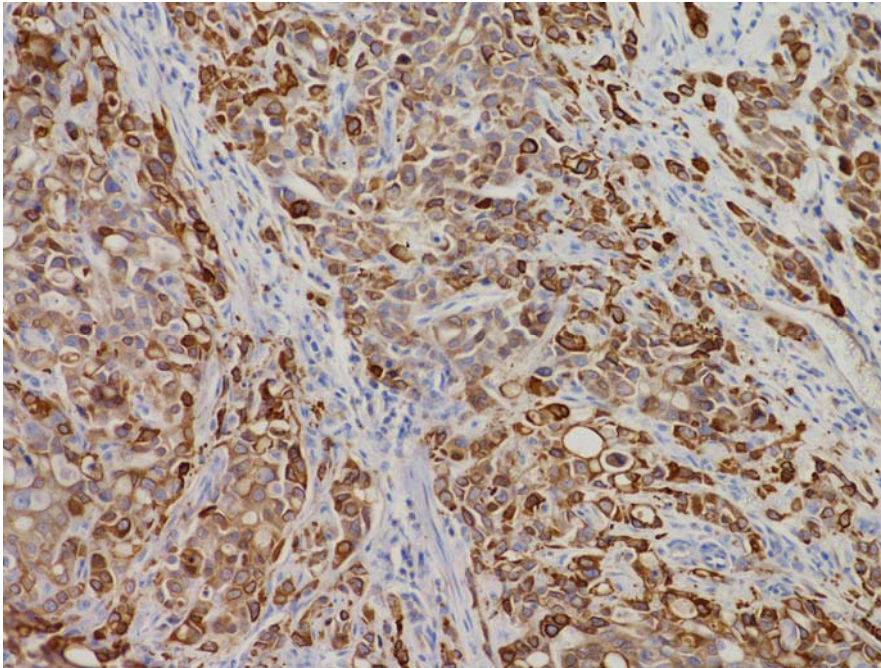


Figura 6.1 – Cane, cavità nasale. Carcinoma a cellule di transizione. Area di intensa positività citoplasmatica per COX-2. Contrasto con ematossilina. 200x.

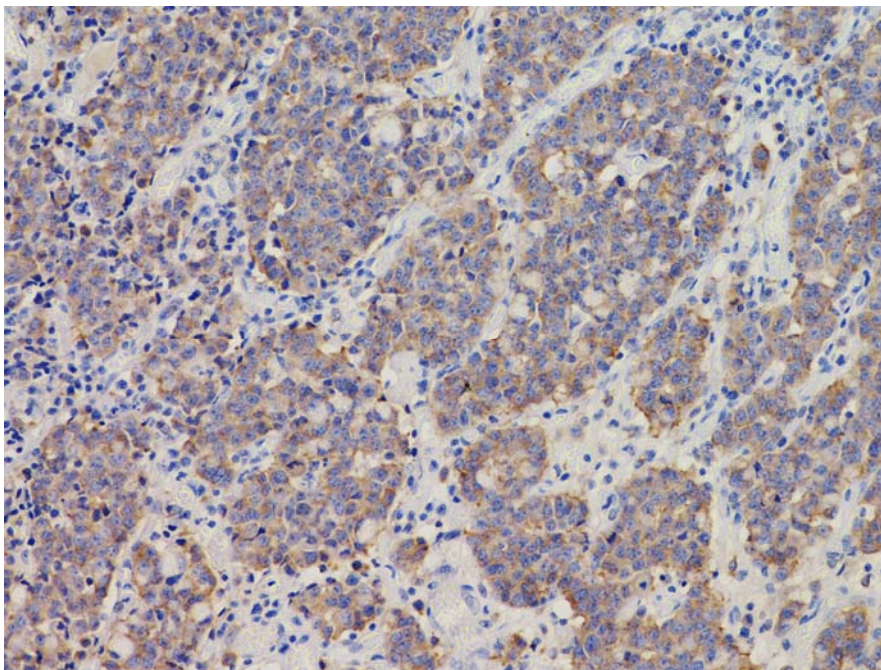


Figura 6.2 – Cane, cavità nasale. Carcinoma indifferenziato. Debole e diffusa positività citoplasmatica per VEGF. Contrasto con ematossilina. 200x.

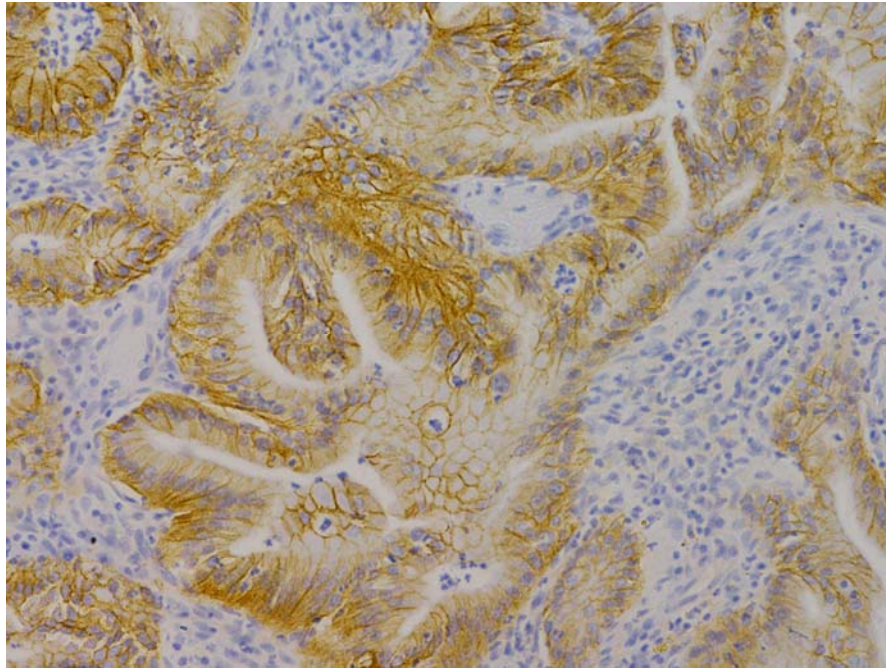


Figura 6.3 – Cane, cavità nasale. Adenocarcinoma papillare. Moderata e diffusa positività di membrana per EGFR. Contrasto con ematossilina. 200x.

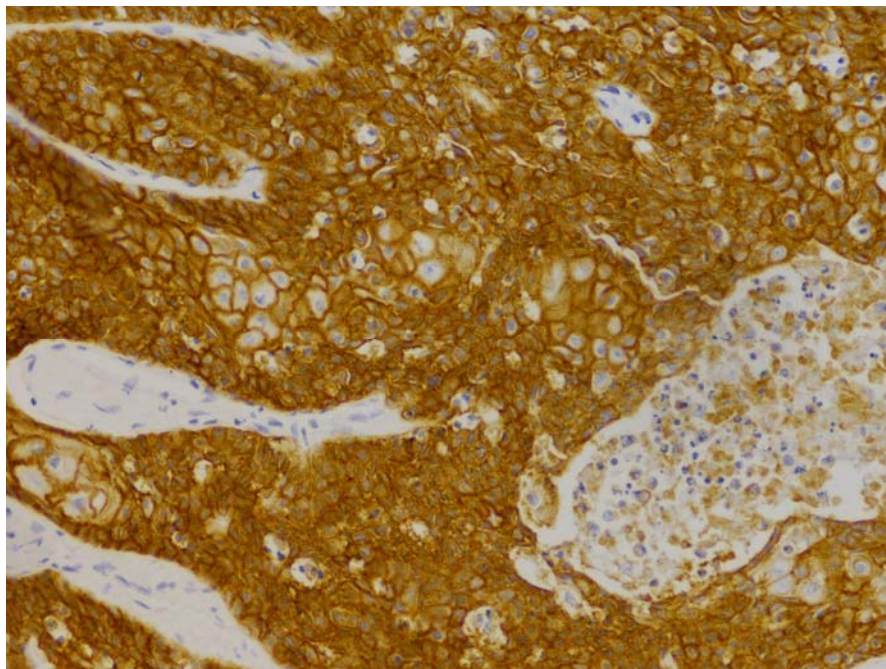


Figura 6.4 – Cane, cavità nasale. Carcinoma adenosquamoso. Marcata e diffusa positività di membrana per EGFR. Contrasto con ematossilina. 200x.

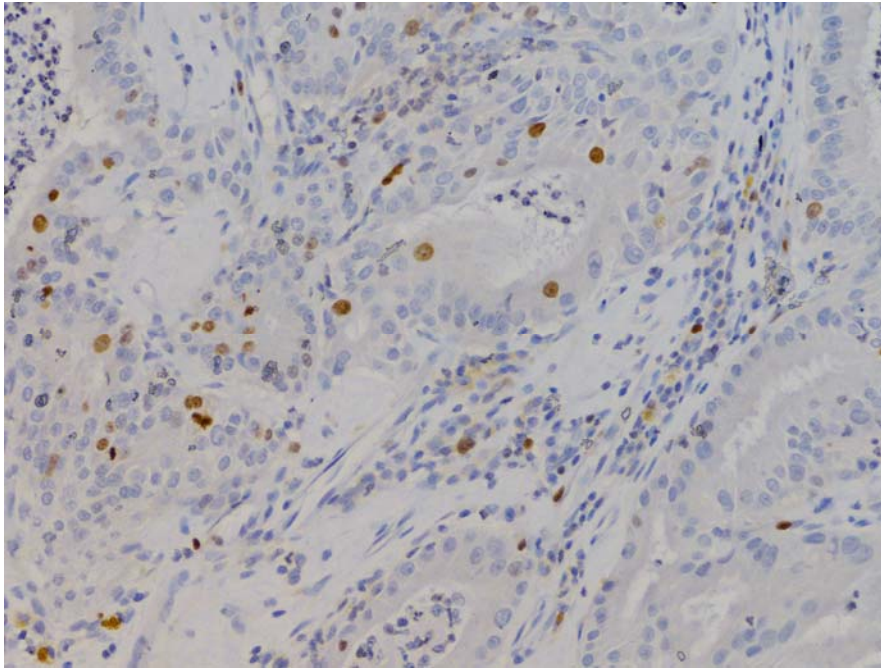


Figura 6.5 – Cane, cavità nasale. Adenocarcinoma tubulo - papillare. Bassa attività proliferativa (Ki67-*index* inferiore al 15%). Contrasto con ematossilina. 200x.

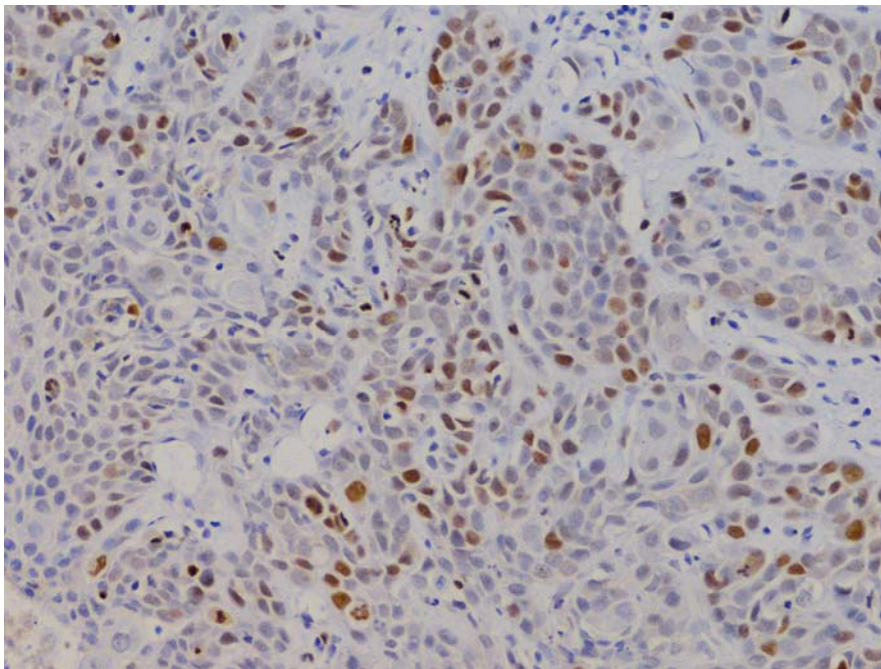


Figura 6.6 – Cane, cavità nasale. Carcinoma squamocellulare. Elevata attività proliferativa (Ki67-*index* pari al 40%). Contrasto con ematossilina. 200x.

Bibliografia

- Belshaw Z, Constantio-Casas F, Brearley MJ, Dunning MD, Holmes MA, Dobson JM. COX-2 expression and outcome in canine nasal carcinomas treated with hypofractionated radiotherapy. *Vet Comp Oncol* 2011;9:141-148.
- Borzacchiello G, Paciello O, Papparella S. Expression of Cyclooxygenase-1 and 2 in canine nasal carcinomas. *J Comp Pathol* 2004;131:70-76.
- Fu DR, Kato D, Watabe A, Endo Y, Kadosawa T. Prognostic utility of apoptosis index, Ki-67 and survivin expression in dogs with nasal carcinoma treated with orthovoltage radiation therapy. *J Vet Med Sci* 2014;76:1505-1512.
- Impellizeri JA, Esplin DG. Expression of cyclooxygenase-2 in canine nasal carcinomas. *Vet J* 2008;176:408-410.
- Kennedy AS, Raleigh JA, Perez GM, Calkins DP, Thrall DE, Novotny DB, Varia MA. Proliferation and hypoxia in human squamous cell carcinoma of the cervix: first report of combined immunohistochemical assays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:897-905.
- Kleiter M, Malarkey DE, Ruslander DE, Thrall DE. Expression of cyclooxygenase-2 in canine epithelial nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 2004;45:255-260.
- Melzer K, Guscetti F, Rohrer Bley C, Sumova A, Roos M, Kaser-Hotz B. Ki67 reactivity in nasal and periocular squamous cell carcinomas in cats treated with electron beam radiation therapy. *J Vet Intern Med* 2006;20:676-681.
- Shiomitsu K, Johnson CL, Malarkey DE, Pruitt AF, Thrall DE. Expression of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor in malignant canine epithelial nasal tumours. *Vet Comp Oncol* 2009;7:106-114.
- Thariat J, Yildirim G, Mason KA, Garden AS, Milas L, Ang KK. Combination of radiotherapy with EGFR antagonists for head and neck carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology* 2007;12:99-110.