



UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

**Gli effetti avversi nel trattamento  
chemioterapico del linfoma del cane:  
osservazioni in due protocolli differenti  
applicati in due centri oncologici**

***Candidato***

Francesco Lotti

***Relatore***

Prof. George Lubas

***Correlatore***

Dott.ssa Alessandra Gavazza

***ANNO ACCADEMICO 2013/2014***

# INDICE

<b>1</b>	<b>IL LINFOMA.....</b>	<b>10</b>
1.1	<b>INCIDENZA .....</b>	<b>10</b>
1.2	<b>EZIOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA.....</b>	<b>11</b>
1.3	<b>CLASSIFICAZIONE .....</b>	<b>12</b>
1.3.1	<i>CLASSIFICAZIONE ANATOMICA.....</i>	<i>12</i>
1.3.2	<i>CLASSIFICAZIONE DI RAPPAPORT (1966).....</i>	<i>15</i>
1.3.3	<i>CLASSIFICAZIONE DI KIEL E KIEL UPDATED .....</i>	<i>15</i>
1.3.4	<i>CLASSIFICAZIONE WORKING FORMULATION.....</i>	<i>22</i>
1.3.5	<i>CLASSIFICAZIONE WHO.....</i>	<i>24</i>
1.3.6	<i>CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA WHO.....</i>	<i>24</i>
1.4	<b>SINTOMATOLOGIA CLINICA .....</b>	<b>27</b>
1.5	<b>DIAGNOSI .....</b>	<b>32</b>
1.5.1	<i>DIAGNOSI DI LABORATORIO .....</i>	<i>33</i>
1.5.2	<i>ESAME CITOLOGICO .....</i>	<i>34</i>
1.5.3	<i>IMMUNOFENOTIPO .....</i>	<i>36</i>
1.6	<b>STADIO CLINICO .....</b>	<b>37</b>
1.7	<b>FATTORI PROGNOSTICI.....</b>	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>LA TERAPIA.....</b>	<b>42</b>
2.1	<b>PRINCIPI DI CHEMIOTERAPIA .....</b>	<b>43</b>
2.1.1	<i>MODELLI DI CRESCITA NEOPLASTICA .....</i>	<i>44</i>
2.1.2	<i>LA CHEMIORESISTENZA DELLE CELLULE NEOPLASTICHE .....</i>	<i>46</i>
2.1.3	<i>IL MODELLO DI GOLDIE-COLDMAN E LA FARMACORESISTENZA .....</i>	<i>48</i>
2.1.4	<i>CALCOLARE LA DOSE APPROPRIATA DI CHEMIOTERAPICO.....</i>	<i>50</i>
2.1.5	<i>MODALITA' DI SOMMINISTRAZIONE DEI CHEMIOTERAPICI.....</i>	<i>50</i>
2.1.6	<i>VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA CHEMIOTERAPIA: CRITERI VCOG.....</i>	<i>52</i>
2.2	<b>I FARMACI CHEMIOTERAPICI.....</b>	<b>54</b>
2.2.1	<i>AGENTI ALCHILANTI.....</i>	<i>55</i>
2.2.2	<i>AGENTI ANTIMETABOLITI.....</i>	<i>57</i>
2.2.3	<i>ANTIBIOTICI ANTITUMORALI .....</i>	<i>58</i>
2.2.4	<i>ALCALOIDI DELLE PIANTE.....</i>	<i>60</i>
2.2.5	<i>ORMONI E ALTRI COMPOSTI.....</i>	<i>60</i>

<b>2.3</b>	<b>TOSSICITA' ASSOCIATA A CHEMIOTERAPIA.....</b>	<b>61</b>
2.3.1	TOSSICITA' EMATOLOGICA .....	64
2.3.2	TOSSICITA' GASTROENTERICA.....	71
2.3.3	TOSSICITA' CARDIACA .....	76
2.3.4	CISTITE EMORRAGICA STERILE.....	78
2.3.5	TOSSICITA' CUTANEA .....	81
<b>2.4</b>	<b>I PROTOCOLLI CHEMIOTERAPICI .....</b>	<b>85</b>
2.4.1	MONOTERAPIA VS POLICHEMIOTERAPIA .....	86
2.4.2	PROTOCOLLI E STRATEGIE TERAPEUTICHE .....	91
2.4.3	I PROTOCOLLI CHEMIOTERAPICI: LA FASE DI INDUZIONE.....	92
2.4.4	MANTENIMENTO O NON MANTENIMENTO? .....	95
2.4.5	FASE DI REINDUZIONE DELLA REMISSIONE O DI SALVATAGGIO .....	97
<b>2.5</b>	<b>ALTRE SOLUZIONI TERAPEUTICHE: L'IMMUNOTERAPIA .....</b>	<b>100</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>108</b>
<b>3.1</b>	<b>CASISTICA.....</b>	<b>108</b>
3.1.1	PROTOCOLLO TERAPEUTICO IMPIEGATO PRESSO L'OSPEDALE DIDATTICO VETERINARIO "M. MODENATO".....	112
3.1.2	PROTOCOLLO TERAPEUTICO IMPIEGATO PRESSO LA CLINICA VETERINARIA "VALDINIEVOLE" .....	113
<b>3.2</b>	<b>PROCEDIMENTO DIAGNOSTICO: VISITA CLINICA E AGO ASPIRATO LINFONODALE.....</b>	<b>114</b>
<b>3.3</b>	<b>STADIAZIONE CLINICA DELLA MALATTIA .....</b>	<b>115</b>
3.3.1	EMOGRAMMA .....	116
3.3.2	PROFILO BIOCHIMICO .....	117
3.3.3	PROFILO COAGULATIVO.....	117
3.3.4	ESAME DELLE URINE.....	117
3.3.5	AGO ASPIRATO DI FEGATO E MILZA.....	118
3.3.6	PRELIEVO ED ESAME DEL MIDOLLO OSSEO.....	118
3.3.7	IMMUNOFENOTIPIZZAZIONE .....	118
3.3.8	ECOGRAFIA ADDOMINALE .....	119
3.3.9	RADIOGRAFIA TORACICA.....	119
3.3.10	ELETTROFORESI DELLE PROTEINE SIERICHE .....	119
3.3.11	IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA .....	119

<b>3.4</b>	<b>FOLLOW UP SETTIMANALE .....</b>	<b>120</b>
<b>3.5</b>	<b>CLASSIFICAZIONE DEGLI EFFETTI COLLATERALI OGGETTO DI STUDIO</b>	<b>120</b>
<b>3.6</b>	<b>INDAGINE STATISTICA.....</b>	<b>121</b>
<b>4</b>	<b>RISULTATI .....</b>	<b>123</b>
<b>4.1</b>	<b>PREMESSA.....</b>	<b>123</b>
<b>4.2</b>	<b>EFFETTI SULL'EMOGRAMMA .....</b>	<b>123</b>
4.2.1	<i>NEUTROPENIA.....</i>	<i>123</i>
4.2.2	<i>ANEMIA.....</i>	<i>127</i>
4.2.3	<i>TROMBOCITOPENIA.....</i>	<i>131</i>
<b>4.3</b>	<b>EFFETTI COLLATERALI GASTROENTERICI.....</b>	<b>134</b>
4.3.1	<i>VOMITO .....</i>	<i>134</i>
4.3.2	<i>DIARREA .....</i>	<i>137</i>
4.3.3	<i>ANORESSIA/DISORESSIA .....</i>	<i>140</i>
<b>4.4</b>	<b>EFFETTI COLLATERALI NON GASTROENTERICI .....</b>	<b>143</b>
4.4.1	<i>FEBBRE.....</i>	<i>143</i>
4.4.2	<i>PERDITA DI PESO .....</i>	<i>146</i>
<b>5</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>151</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>161</b>

## **RIASSUNTO**

### ***Gli effetti avversi nel trattamento chemioterapico del linfoma del cane: osservazioni in due protocolli differenti applicati in due centri oncologici***

**Parole chiave:** Linfoma, chemioterapia, COP, Madison-Wisconsin, effetti collaterali.

Il linfoma è la neoplasia maligna più comune del sistema emopoietico del cane. La chemioterapia rappresenta il pilastro terapeutico perché è in grado di prolungare i tempi di sopravvivenza dei pazienti, anche se talvolta può accompagnarsi a manifestazioni tossiche. Lo scopo di questa tesi è stato quello di comparare la frequenza e la gravità degli effetti avversi più comuni del trattamento chemioterapico del linfoma canino. Sono stati selezionati 24 casi (2007 – 2014), 13 trattati con un protocollo COP presso l’Ospedale didattico “M. Modenato” dell’Università di Pisa (OD) e 11 con un protocollo Madison-Wisconsin presso la Clinica Veterinaria “Valdinievole” di Monsummano Terme (CV). I due schemi terapeutici sono stati valutati per la comparsa di effetti collaterali (classificati secondo i criteri del VCOG) durante le prime 9 settimane di trattamento. Dai risultati emerge che i disturbi ematologici maggiormente rappresentati sono l’anemia (85% dei pazienti OD vs. 82% dei pazienti CV) e la neutropenia (85% OD vs. 55% CV) rispetto alla trombocitopenia (31% OD vs. 36% CV). Gli effetti avversi di natura gastroenterica sono comparsi spesso durante il protocollo ma non hanno quasi mai influito sulla qualità di vita dei pazienti (vomito 46% OD vs 27% CV, diarrea 23% OD e 36% CV, anoressia 46% OD e 55% CV). La febbre è stata un riscontro clinico poco presente (23% OD vs 36% CV) rispetto alla perdita di peso (62% OD vs 55% CV), effetto collaterale evidenziato maggiormente durante le prime settimane di trattamento. Da questa indagine retrospettiva emergono alcuni riscontri: la vincristina è il farmaco che sembra avere causato maggiori effetti collaterali di natura gastroenterica ed ematologica; in merito a questo è possibile che la combinazione di vincristina e ciclofosfamide abbia influito maggiormente sulla neutropenia, più grave e più frequente nei pazienti in cura presso l’Ospedale Didattico. Questo effetto collaterale, però, così come gli altri oggetto di studio, non ha mai comportato un peggioramento della qualità di vita dei pazienti in entrambe le sedi. Con questa tesi si è cercato di comparare la frequenza e la gravità degli effetti collaterali di due protocolli molto utilizzati nella terapia del linfoma canino: dai

risultati ottenuti, seppur su una casistica ridotta, non emergono differenze statisticamente significative fra le due sedi. I farmaci utilizzati nella terapia del linfoma canino, diversamente da quanto accade nell'uomo, sono ben tollerati e la chemioterapia rappresenta un'opzione valida per prolungare la vita dell'animale.

### *Abstract*

#### ***Side effects of the canine lymphoma chemotherapy: notation on two different protocols used in two oncologic practices.***

**Keyword:** Lymphoma, COP protocol, Madison-Wisconsin protocol, side effects.

Lymphoma is the most common canine hemopoietic neoplastic disease. Chemotherapy is the therapeutic mainstay because can increase the survival of dog affected, even if side effects could occur. The aim of this thesis was to compare the rate and the severity of the more common side effects in the canine lymphoma chemotherapy. We've sorted out 24 cases (2007-2014), 13 treated with COP protocol at the veterinary teaching hospital "M. Modenato" of the Pisa University (OD) and 11 treated with the Madison-Wisconsin protocol at the "Valdinievole" veterinary clinic in Monsummano Terme (CV). Both chemotherapy protocols were evaluated for the appearance of side effects (according to VCOG criteria) during the first nine weeks of therapy. From the results it was evidenced that the more common hematologic disorders were anemia (85% OD cases vs 82% CV cases) and neutropenia (85% OD vs 55% CV) compared to thrombocytopenia (38% OD vs 45% CV). Gastrointestinal side effects were very common but almost never affect life quality of the patients (vomiting 46% OD vs 27% CV, diarrhea 23% OD vs 36% CV, anorexia 46% OD vs 55% CV). Fever was a less common sign (23% OD vs 36% CV) compared with weight loss (54% OD vs 55% CV), side effect mainly seen in the early weeks of therapy. This retrospective survey pointed out some interesting clues: vincristine causes more gastrointestinal and hematological side effects, in this context the combination vincristine/cyclophosphamide could be the trigger of neutropenia that has been more severe and frequent in the OD cases. This side effect, however, as well as the others mentioned in this study did not affected severely the quality of life of dogs both in OD and in CV. With this study we've tried to compare the rate and the severity of some side effects of

two different chemotherapy protocols for canine lymphoma: from our results there aren't statistically significant differences in both OD and CV. The drugs that we have used for the therapy of canine lymphoma, differently from the human lymphoma therapy, are well tolerated and the chemotherapy is a good option to prolong the life of the dog affected.

# INTRODUZIONE

Il linfoma è la neoplasia maligna più comune del sistema emopoietico del cane. Si tratta di una neoplasia sistemica a carattere progressivo, caratterizzata da una proliferazione incontrollata di cellule del sistema linfoide che interessa linfonodi, altri visceri solidi (come fegato o milza) oppure siti extranodali. Il pilastro terapeutico è rappresentato dalla chemioterapia e la scelta terapeutica dipende da numerosi fattori tra cui stadio clinico, grado istologico, presenza di sindromi paraneoplastiche, esperienza personale del veterinario e, non ultimo, impegno economico e temporale da parte del proprietario. L'oncologo medico si può trovare a dover gestire gli effetti collaterali derivanti dalla chemioterapia: i chemioterapici non sono selettivi per le cellule neoplastiche ma bersagliano anche cellule dell'organismo caratterizzate da intensa attività proliferativa (midollo osseo, tratto gastroenterico e cute), accompagnandosi quindi a manifestazioni tossiche. Lo scopo del trattamento deve essere il miglioramento della qualità di vita dell'animale, non necessariamente il prolungamento della sopravvivenza quindi è compito del veterinario informare il proprietario circa gli obiettivi della terapia, i costi e gli eventuali effetti collaterali; se il trattamento si accompagna a scarsa qualità di vita dell'animale, molto spesso il proprietario non è motivato a continuare. In merito a questa considerazione lo scopo di questo lavoro è stato quello di comparare la frequenza e la gravità degli effetti collaterali più comuni conseguenti alla somministrazione di due schemi terapeutici diversi: un protocollo COP eseguito presso l'Ospedale Didattico "M. Modenato" dell'Università di Pisa (OD) e un protocollo Madison-Wisconsin eseguito presso la Clinica Veterinaria Valdinievole di

Monsummano Terme (CV). Nella parte generale di questa tesi si riportano le conoscenze attuali sul linfoma e soprattutto sulla tossicità associata alla chemioterapia così da fornire un supporto teorico alla parte sperimentale. Sono state selezionate 24 cartelle cliniche di cani affetti da linfoma multicentrico (13 in cura presso OD e 11 trattati presso CV, su una casistica totale di 148 casi) per poi esaminare e classificare, in base allo schema dettato dal VCOG (descritto nella prima parte della tesi), gli effetti collaterali più comuni manifestati dai pazienti durante le prime nove settimane di trattamento. collaterali durante le prime 9 settimane, mettendoli così a confronto. La valutazione dei risultati può fornire alcuni interessanti spunti di riflessione per eventuali approfondimenti tra cui la segnalazione degli effetti avversi più comuni, la loro presenza e gravità nei due protocolli impiegati e gli accorgimenti impiegati per limitare i loro effetti clinici.

# 1 IL LINFOMA

Il linfoma è la neoplasia maligna più comune del sistema emopoietico del cane. Si tratta di una neoplasia sistemica a carattere progressivo, caratterizzata da una proliferazione incontrollata di cellule del sistema linfoide che interessa linfonodi, altri visceri solidi (come fegato o milza) oppure siti extranodali (intestino, stomaco, reni, cute, occhio, testicoli, osso, sistema nervoso centrale e periferico)<sup>75</sup>. Il linfoma rientra nel gruppo dei disordini linfoproliferativi insieme alla leucemia linfocitica acuta e a quella cronica. Le leucemie si presentano con un ampio coinvolgimento midollare accompagnato generalmente dalla presenza di un gran numero di cellule neoplastiche nel sangue periferico. I linfomi invece sono neoplasie che originano da masse discrete di tessuto linfoide. La principale differenza fra leucemia e linfoma si basa dunque sull'origine dell'emopatia: la prima origina dal midollo osseo e invade secondariamente il sangue periferico mentre nel linfoma l'invasione del sangue periferico avviene in seguito alla metastasi del midollo osseo da parte delle cellule tumorali<sup>66,142</sup>.

## 1.1 INCIDENZA

Il linfoma rappresenta circa l'80% delle neoplasie emopoietiche e il 5-7% di tutte le neoplasie del cane<sup>75</sup>. L'incidenza annuale in Europa è di circa 30 nuovi casi ogni 100.000, anche se si pensa che sia sottostimata a causa delle difficoltà nel recensire la popolazione canina. In genere interessa cani adulti (6-8 anni di età)<sup>28</sup> e la predisposizione alla malattia non sembra essere legata al sesso anche se alcuni autori riportano un rischio minore per le femmine intere<sup>157</sup>. Le razze

maggiormente predisposte risultano essere Bull Mastiff, Golden Retriever, Labrador, Bulldog, San Bernardo, Airedale Terrier, Scottish Terrier e Boxer<sup>147</sup>; i cani di quest'ultima razza, secondo uno studio di Modiano e collaboratori, sarebbero particolarmente predisposti a sviluppare il Linfoma di tipo T e risponderebbero quindi peggio alla chemioterapia<sup>91</sup>.

## **1.2 EZIOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA**

Il linfoma canino é considerato una patologia ad eziologia multifattoriale dal momento che non é stato ancora individuato un singolo agente causale; nel gatto invece alcuni tipi di linfoma sono stati associati al virus della leucemia felina (FeLV, feline leukemia virus) e dell'immunodeficienza felina (FIV, feline immunodeficiency virus)<sup>144</sup>. Nel cane, dunque, non esistono prove certe di un'origine retrovirale del linfoma anche se è stato dimostrato che le cellule linfomatose canine posseggono elevate quantità di trascrittasi inversa<sup>140,152</sup>. I fattori ambientali rappresentano un fattore eziologico molto importante nell'insorgenza di questa emopatia, in particolare è stata descritta un'associazione fra l'uso di 2-4 diclorofenossiacetato (un erbicida) da parte dei proprietari e l'insorgenza di linfoma nei cani<sup>44,56</sup>. Per il breve periodo di latenza tra esposizione a un determinato fattore ambientale e comparsa di malattia, il cane rappresenta una sentinella importante di situazioni potenzialmente rischiose per l'uomo<sup>75</sup>. E' stato visto inoltre come l'incidenza di questa patologia aumenti in soggetti residenti in aree industriali<sup>44,56</sup>, esposti a campi magnetici a bassa frequenza<sup>117</sup> o fumo di tabacco<sup>10</sup>. Così come accade nell'uomo, anche nel cane appare sempre più evidente l'associazione tra linfoma e

aberrazioni cromosomiche. In uno studio condotto su 61 cani affetti da linfoma è stato dimostrato come i soggetti con trisomia del cromosoma 13 vantassero una prognosi migliore; ciò era evidenziato dall'aumento della durata della prima remissione e dal tempo di sopravvivenza globale<sup>52</sup>. Nell'eziologia del linfoma sembra essere implicata una disfunzione del sistema immunitario<sup>66</sup>: cani affetti da trombocitopenia immunomediata sembrano essere associati a un rischio maggiore di sviluppare la malattia<sup>61</sup>. Non è stata ancora provata l'associazione fra somministrazione di ciclosporina e l'insorgenza di questa neoplasia ma è possibile che la terapia protratta con questo farmaco (prevalentemente impiegato nel trattamento di dermatiti atopiche, fistole perianali e adeniti sebacee) possa giocare un ruolo nella patogenesi della malattia<sup>13</sup>.

### **1.3 CLASSIFICAZIONE**

La classificazione del linfoma maligno nel cane si basa su localizzazione anatomica, criteri citologici, classificazione istologica e caratteristiche immunofenotipiche<sup>147</sup>. La continua e rapida evoluzione classificativa dei linfomi riflette non solo maggiori conoscenze in campo biologico, ma anche necessità di correlare tipo morfologico a riscontro clinico, ma soprattutto a terapia e prognosi. L'esperienza clinica insegna che, in linea con quanto accade in medicina umana, esistono entità differenti da un punto di vista clinico e biologico, che richiedono pertanto trattamenti diversificati<sup>75</sup>.

#### **1.3.1 CLASSIFICAZIONE ANATOMICA**

La classificazione anatomica suddivide la malattia in quattro forme: multicentrica, alimentare, mediastinica e siti extranodali<sup>66</sup>. La forma

multicentrica è la più frequente, verificandosi nell'80-85% dei casi con presenza di linfadenopatia generalizzata non dolente, che interessa i linfonodi sottomandibolari, prescapolari, ascellari, inguinali e poplitei<sup>75</sup>. Anche i linfonodi non esplorabili fisicamente possono essere aumentati di volume (sottolombari, sacrali e meseraici). La forma alimentare è meno comune e rappresenta il 5-7% dei casi<sup>27</sup>; è caratterizzata da infiltrazione gastroenterica isolata o diffusa, con o senza coinvolgimento linfonodale, splenico ed epatico. I linfomi intestinali possono essere di due tipi: a cellule T (definiti epiteliotropi o enteropathy-type, generalmente a medie-grandi cellule) oppure MALT-type (a piccole cellule con fenotipo B, che insorgono primariamente nella sottomucosa e formano grandi aggregati nodulari intraparietali)<sup>14,75</sup>. La forma mediastinica è piuttosto rara e si verifica nel 2-5% dei casi. Come incidenza è la terza forma di linfoma nel cane e generalmente interessa i linfonodi mediastinici craniali, il timo o entrambi. L'ipercalcemia associata a linfoma mediastinico è riportata nel 10-40 % dei cani: in uno studio condotto su 37 cani affetti da linfoma (con ipercalcemia concomitante) il 43% di essi risultava aver sviluppato una forma mediastinica. E' stato visto inoltre che il linfoma mediastinico è spesso associato a un fenotipo T e a una prognosi sfavorevole<sup>33,120,121,143,147</sup>.

La forma extranodale comprende il linfoma cutaneo, encefalico, renale, del tessuto osseo, cardiaco, intravascolare, nasale, muscolare, polmonare, uretrale, vescicale e di strutture oculari<sup>66</sup>.

Il linfoma cutaneo è poco comune nel cane e nel gatto, rappresentando il 3-8 % di tutti i tumori cutanei. Esso può essere primitivo oppure rappresentare localizzazione secondaria di forma multicentrica. Si riconoscono due forme di linfoma cutaneo: non epiteliotropo ed

epiteliotropo (CETL). Quest'ultimo è caratterizzato da un'infiltrazione di linfociti T neoplastici con tropismo specifico per epidermide e strutture annesse; esso descrive uno spettro di malattie cutanee che comprendono micosi fungoide, sindrome di Sezary e reticulosi pagetoide<sup>39,92</sup>. L'eziologia rimane sconosciuta ma si ipotizza che dermatiti atopiche possano predisporre a sviluppo di CETL: i linfociti T infatti possono proliferare ed espandersi in senso clonale, se stimolati da segnali antigenici persistenti o anomalie funzionali delle cellule di Langherans. Molti cani affetti da linfoma cutaneo presentavano una storia clinica di dermatiti croniche ma la correlazione fra le due malattie è scarsamente documentata<sup>39</sup>. I gatti con linfoma cutaneo sono tipicamente aviremici per FeLV anche se metodiche d'immunoistochimica e PCR rivelano la presenza del virus<sup>23</sup>.

Il linfoma oculare è caratterizzato da lesioni variabili come fotofobia, blefarospasmo, epifora, ifema, uveite anteriore, coinvolgimento corio-retinico e infiltrazione del nervo ottico fino a cecità improvvisa; talvolta si tratta di una forma multicentrica che colpisce secondariamente gli occhi (ciò può accadere nel 33-37 % dei linfomi)<sup>142</sup>.

La forma nervosa è caratterizzata da una varietà di sintomi neurologici a seconda del tratto nervoso colpito (crisi epilettiche o paralisi) e viene distinta in tre forme: epidurale, neuroepidurale e dei nervi periferici<sup>66,142</sup>.

Il linfoma intravascolare o angioendoteliomatosi è una rara malattia sistemica caratterizzata dalla proliferazione di linfociti neoplastici nel lume dei vasi sanguigni di piccola e media taglia: la progressiva occlusione neoplastica vascolare ad opera di cellule neoplastiche comporta trombosi, emorragie e infarti. In questa forma non c'è

coinvolgimento del midollo osseo e non si osservano cellule neoplastiche nello striscio periferico<sup>84</sup>.

Altre forme descritte sono il linfoma osseo (molto raro con pochissimi casi riportati in letteratura) e quello renale, più frequente nel gatto rispetto al cane. Rari casi descritti in letteratura sono il linfoma vescicale<sup>70</sup> e della cavità nasale<sup>60</sup>.

### **1.3.2 CLASSIFICAZIONE DI RAPPAPORT (1966)**

La prima classificazione istologica risale al 1966 ed è quella di Rappaport che suddivide i linfomi in cinque tipi in base alle caratteristiche morfologiche delle cellule predominanti; questo tipo di classificazione è caduta in disuso perché limitata e troppo semplicistica, inoltre non è in grado di fornire indicazioni utili per stabilire una prognosi e una terapia<sup>110,142</sup>.

***Tabella 1.3.2-1 Classificazione istologica di Rappaport (1966) (ripreso da 66 e modificato)***

<b>Tipo 1</b>	linfoma indifferenziato
<b>Tipo 2</b>	linfoma linfoblastico poco differenziato
<b>Tipo 3</b>	linfoma linfocitico ben differenziato
<b>Tipo 4</b>	linfoma misto linfocitico-istiocitico
<b>Tipo 5</b>	linfoma istiocitico

### **1.3.3 CLASSIFICAZIONE DI KIEL E KIEL UPDATED**

Una delle classificazioni più usate è senza dubbio quella di Kiel che suddivide i linfomi in due gruppi: quello a basso grado di malignità e quello ad elevato grado di malignità. Questa classificazione citopatologica unisce ad aspetti morfologici anche caratteristiche immunofenotipiche. Nel primo gruppo si trovano i linfomi linfocitici B

e T, le micosi fungoidi, la sindrome di Sézary, i linfoplasmocitici, il plasmocitico, il centrocitico, il centroblastico-centrocitico (follicolare, follicolare diffuso, diffuso). Al secondo gruppo invece appartengono i linfomi centroblastici (puri e misti), i linfoblastici (B, tipo Burkitt, T a cellule convolute, non classificabili), gli immunoblastici (con differenziazione plasmocitica, B) e gli anaplastici. In seguito la classificazione di Kiel è stata rivista e aggiornata (Updated Kiel); essa divide il linfoma in base al fenotipo e al grado di malignità.

**Tabella 1.3.3-1 Classificazione di Kiel updated (ripreso da 66 e modificato)**

<b>Linfomi B</b>	
<b>Basso grado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitico</li> <li>• Linfoplasmocitico</li> <li>• Prolinfocitico</li> <li>• Centrocitico</li> <li>• Centroblastico-citico</li> <li>• Cellule medie macronuceolate</li> </ul>
<b>Alto grado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Centroblastico monomorfo</li> <li>• Centroblastico polimorfo</li> <li>• Immunoblastico</li> <li>• Tipo Burkitt</li> <li>• Plasmocitoide</li> <li>• Linfoblastico</li> </ul>
<b>Linfomi T</b>	
<b>Basso grado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Piccole cellule chiare</li> <li>• Prolinfocitico</li> <li>• Pleomorfo a piccole cellule</li> <li>• Micosi fungoide</li> </ul>
<b>Alto grado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pleomorfo misto</li> <li>• Pleomorfo a grandi cellule</li> <li>• Immunoblastico</li> <li>• Plasmocitoide</li> <li>• Linfoblastico</li> </ul>

**Linfoma linfocitico:** si presenta come un tappeto di cellule omogenee, composto da piccoli linfociti molto simili a quelli normali; citoplasma scarso, nucleo rotondo e cromatina addensata. I nucleoli sono invisibili e le mitosi eccezionali: questo spiega la crescita lenta di questo tipo di linfoma.

**Linfoma linfoplasmocitico:** detto anche “immunocitoma”; in questo caso troviamo una popolazione eterogenea di cellule piccole con nucleo eccentrico rotondo, citoplasma nettamente basofilo e presenza tipica di un’area chiara perinucleare. Assenza di mitosi e macrofagi fagocitanti.

**Linfoma prolinfocitico:** può avere sia fenotipo B che T. E’ caratterizzato da una predominanza di cellule di taglia piccola che hanno nuclei con cromatina densa e nettamente nucleolata, citoplasma abbondante. Rare mitosi, sono linfomi a crescita lenta.

**Linfoma centrocitico:** è assai raro. Si identifica con la presenza di una popolazione cellulare, di numero variabile, caratterizzata da un nucleo indentato di taglia leggermente superiore a quello dei linfociti normali. La cromatina è sempre a zolle, ma un po' meno addensata rispetto ai linfociti normali.

**Linfoma centroblastico-centrocitico:** raro nel cane, caratterizzato dalla presenza di cellule di taglia variabile piccole e medie. Le cellule più piccole presentano le caratteristiche dei centroцити (da ricercare le incisive nucleari, talvolta poco evidenti), mentre le cellule medie sono rappresentate da centroblasti le cui caratteristiche sono: cromatina fine, numerosi nucleoli addossati alla membrana nucleare, nucleo talvolta irregolare e citoplasma basofilo. La presenza di un miscuglio di centroцити e centroblasti può far pensare erroneamente ad una iperplasia follicolare; il carattere disperso dei centroblasti,

l'assenza di plasmocitosi e di macrofagi fagocitanti, nonché il ridotto indice mitotico ne confermano il carattere tumorale.

**Linfoma a cellule medie macronucleolate:** è caratterizzato da una grande omogeneità di cellule tumorali di taglia variabile, piccola-media (1.5 volte il volume di un globulo rosso). Il nucleo di tali cellule presenta cromatina decondensata ed un voluminoso nucleolo centrale. Il citoplasma è poco esteso, moderatamente basofilo. L'indice mitotico è ridotto e rispondono negativamente al marker di proliferazione Ki-67. Sembra che le cellule tumorali di questo linfoma derivino dalla zona marginale del follicolo secondario del linfonodo. Può evolvere a linfoma centroblastico biologicamente aggressivo.

**Linfoma centroblastico monomorfo:** poco frequente ed è caratterizzato da una popolazione omogenea di cellule voluminose (taglia superiore al volume di due eritrociti). Le cellule linfomatose presentano un nucleo rotondo centrale, cromatina fine e numerosi nucleoli in posizione iuxta-nucleare, citoplasma scarso di media basofilia. Mitosi frequenti e grado di malignità elevato.

**Linfoma centroblastico polimorfo:** molto frequente nel cane, appartiene a questo gruppo, costituito da più tipi cellulari. Sul preparato linfonodale infatti si possono ritrovare cellule di taglia media, rappresentate dai centroblasti (in percentuale elevata), piccole cellule blastiche con nucleo rotondo, cromatina decondensata e irregolarmente rinforzata, nucleoli multipli e prominenti, citoplasma stretto e iperbasofilo; cellule di taglia grande di tipo immunoblastico (mai superiori al 20%) e cellule medie macronucleolate della zona marginale (presenti in percentuale minore). Sono frequenti i macrofagi fagocitanti che, per la loro particolare distribuzione in mezzo alle cellule linfomatose, assumono il cosiddetto aspetto a cielo stellato.

L'indice mitotico è variabile: da medio ad elevato. Questo tipo di linfoma proprio per il suo carattere eterogeneo, può essere ulteriormente diviso in due sottogruppi: uno in cui predominano le piccole cellule (PSC ovvero *predominantly small cell*), l'altro in cui predominano le cellule più grandi (PLC ovvero *predominantly large cell*). Può essere esclusivamente a fenotipo B.

**Linfoma Immunoblastico:** poco frequente e talvolta difficile da distinguere dal precedente. Caratterizzato da una elevata percentuale di cellule di tipo immunoblastico (maggiori dell'80%) che presentano le seguenti caratteristiche: taglia molto grande, nucleo irregolare, volume nucleolare elevato, ampio citoplasma basofilo. Talvolta si può ritrovare una stretta differenziazione plasmocitaria. L'indice mitotico è alto. Può avere fenotipo sia B che T.

**Linfoma Tipo Burkitt:** è molto aggressivo, caratterizzato da una proliferazione omogenea di cellule di taglia piccola e con nucleo rotondo, cromatina irregolarmente rinforzata, nucleoli multipli o singoli prominenti, citoplasma ridotto e iperbasofilo. L'indice mitotico è elevato.

**Linfoma plasmocitoide:** può essere di fenotipo B o T con una popolazione eterogenea di cellule piccole o medie, nucleo eccentrico con piccoli nucleoli; indice mitotico elevato, è un linfoma molto aggressivo e chemioresistente.

**Linfoma linfoblastico:** caratterizzato dalla proliferazione di cellule piccole-medie con nucleo irregolare, spesso convoluto, cromatina fine, de condensata e nucleoli discreti e poco evidenti; il citoplasma è moderatamente esteso e basofilo. Indice mitotico elevato con numerose mitosi raggruppate. Secondo la classificazione di Kiel aggiornata può avere entrambi i fenotipi.

**Linfoma a piccole cellule chiare:** appartiene al gruppo T con basso grado di malignità. Si caratterizza per la presenza di piccole cellule tumorali, nucleo irregolare unipolare, ampio citoplasma pallido ed esteso che talvolta può contenere fini granulazioni azzurrofile.

**Linfoma pleomorfo:** possono a loro volta essere suddivisi in tre gruppi: il primo caratterizzato da cellule di taglia piccola e da un indice mitotico basso; il secondo caratterizzato da un misto di cellule di taglia piccola- media e facente parte dei linfomi con grado di malignità elevato; il terzo costituito da cellule di taglia grande e grado di malignità elevato. Presentano tutti un fenotipo T e sono caratterizzati dall'aver un nucleo irregolare, una cromatina fine e un citoplasma chiaro, scarsamente basofilo.

**Micosi Fungoide:** Linfoma T cutaneo primariamente epidermotropo che secondariamente può invadere anche i linfonodi locoregionali. La morfologia di questo linfoma è variabile; si possono infatti avere cellule con nucleo cerebriforme, cellule di aspetto monocitoide, entrambe con cromatina fine e citoplasma abbondante e chiaro, ed infine grandi cellule granulose con citoplasma pallido contenente delle grosse granulazioni azzurrofile. Fanno parte dei linfomi T a basso grado di malignità.

**Linfoma anaplastico:** Contemplato nella prima classificazione di Kiel, è caratterizzato dalla presenza di cellule di taglia grande, nucleo molto irregolare, talvolta binucleato, citoplasma esteso ed intensamente basofilo.

Le principali critiche a tale classificazione sono: variabilità interoperatore, mancato riconoscimento di determinate entità patologiche e necessità di validare il risultato con tecniche d'immunofenotipizzazione<sup>75</sup>.

### **1.3.4 CLASSIFICAZIONE WORKING FORMULATION**

La Working Formulation è una classificazione proposta dal National Cancer Institute (1982); questo sistema classifica i linfomi in base al pattern (nodulare o diffuso) al tipo di cellule (piccole/grandi cellule clivate/non clivate, immunoblastiche o linfoblastiche) e al grado di malignità (basso, intermedio o elevato) ma non fornisce informazioni circa l'immunofenotipo del tumore<sup>98,147</sup>.

La classificazione di Kiel e la Working Formulation sono molto usate essendo in grado di fornire indicazioni prognostiche: per essere clinicamente utili questi sistemi di classificazione devono fornire informazioni circa la risposta alla terapia, il mantenimento della remissione e la sopravvivenza. Numerosi studi si sono serviti di questi due schemi classificativi; Teske et al. (1994) in uno studio su 116 cani con linfoma ha stabilito che: 16,4% erano a basso grado di malignità, 75% grado intermedio, 6% grado elevato e 2,6% apparteneva al gruppo miscellanea. Da questo importante studio possiamo inoltre constatare la prevalenza dell'immunofenotipo B (58,9%) rispetto al T (37,9%); la maggioranza di questi linfomi risultavano inoltre essere a grandi cellule e centroblastici secondo le classificazioni Working formulation e di Kiel updated, rispettivamente<sup>135</sup>. Da altri studi è emerso come i linfomi ad alto grado rispondessero molto bene al trattamento chemioterapico, significativamente più spesso rispetto a quelli a basso grado; tuttavia i cani con linfomi a basso grado di malignità possono sopravvivere più a lungo senza chemioterapia<sup>36,149</sup>.

**Tabella 1.3.4-1 National Cancer Institute Working Formulation, 1982 (ripreso da 66 e modificato)**

<p><b><i>Basso grado di malignità</i></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diffuso a piccoli linfociti (linfocitico,plasmocitoide)</li> <li>• Follicolare a piccole cellule clivate</li> <li>• Follicolare misto</li> </ul>
<p><b><i>Medio grado di malignità</i></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Follicolare a grandi cellule non clivate</li> <li>• Diffuso a grandi cellule non clivate</li> <li>• Diffuso a piccole cellule clivate</li> <li>• Diffuso misto</li> </ul>
<p><b><i>Alto grado di malignità</i></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunoblastico</li> <li>• Linfoblastico (convoluto o meno)</li> <li>• Diffuso a piccole cellule non clivate (Burkitt o meno)</li> </ul>

### 1.3.5 CLASSIFICAZIONE WHO

Un altro tipo di classificazione si basa sulla stadiazione clinica del linfoma ed è quella proposta dall'organizzazione mondiale della sanità (WHO): tale classificazione suddivide la malattia in cinque stadi e due sottostadi.

**Tabella 1.3.5-1 Classificazione WHO (ripreso da 66 e modificato)**

<b>Stadio</b>	<b>Organi interessati</b>
<b>I</b>	Limitato a un solo linfonodo o tessuto linfatico in un solo organo
<b>II</b>	Linfonodi multipli in area regionale
<b>III</b>	Coinvolgimento generalizzato dei linfonodi
<b>IV</b>	Coinvolgimento epatico e/o splenico
<b>V</b>	Coinvolgimento ematico e del midollo osseo e/o di altri organi

**Sottostadio a: assenza di segni clinici Sottostadio b: presenza di segni clinici**

### 1.3.6 CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA WHO

Le classificazioni più recenti in medicina umana (WHO e REAL, *Revised European American Lymphoma*) tengono conto di caratteristiche epidemiologiche, cliniche, morfologiche, immunofenotipiche e genetiche, distinguendo precise entità cliniche provviste di proprio schema prognostico e terapeutico. La classificazione WHO umana è stata applicata con successo al linfoma canino grazie agli sforzi di Valli e collaboratori (2002)<sup>148</sup>. Questo tipo di classificazione istopatologica è ben riproducibile tra patologi e permette di confrontare dati (clinici, prognostici e terapeutici) tra istituzioni diverse proponendo l'architettura e l'immunofenotipo della malattia. Essa appare utile per riconoscere entità patologiche distinte e inquadrarle da un punto di

vista biologico e prognostico: la classificazione WHO, infatti, non prevede raggruppamenti in base al grado di malignità ma fornisce piuttosto un elenco di entità morbose indipendenti<sup>24,75,149</sup>. Secondo studi recenti atti a valutare l'applicabilità di questo sistema di classificazione, gli istotipi più frequenti sono il linfoma a grandi cellule B<sup>4,155</sup> e il linfoma follicolare<sup>149</sup> mentre nel lavoro di Flood-Knapik (2013) su 75 cani emergeva una netta prevalenza del linfoma della zona T<sup>36</sup>. Il linfoma ad architettura follicolare include: linfoma follicolare (immunofenotipo B ed interessa soprattutto i linfonodi), linfoma della zona mantellare (immunofenotipo B, interessa soprattutto la milza) linfoma della zona marginale (immunofenotipo B e interessa linfonodi e milza) linfoma della zona T (immunofenotipo T, interessa soprattutto i linfonodi)<sup>36</sup>. Si tratta di forme biologicamente indolenti, a decorso lento e che tendono ad essere preceduti da periodi più o meno lunghi d'iperplasia benigna. In fasi avanzate si comportano come neoplasie a elevato grado di malignità<sup>36,149</sup>. Il comportamento biologico del linfoma della zona marginale (citologicamente corrisponde al linfoma a medie cellule macronucleolate<sup>40</sup>) dipende dalla sede anatomica d'insorgenza: quello splenico richiede splenectomia ed eventualmente chemioterapia adiuvante<sup>102</sup> mentre la forma linfonodale è biologicamente aggressiva e richiede da subito il trattamento chemioterapico<sup>75,130</sup>.

**Tabella 1.3.6-1 Classificazione istopatologica del linfoma nel cane, secondo WHO (2002) (ripreso da 66 e modificato)**

<p style="text-align: center;"><b>Cellule B</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfoma linfoblastico</li> <li>• Linfoma linfocitico</li> <li>• Linfoma linfocitico di tipo intermedio</li> <li>• Linfoma linfoplasmocitico</li> <li>• Linfoma follicolare (della zona mantellare, del centro follicolare di tipo I-II-III, nodale marginale, splenico marginale)</li> <li>• Linfoma marginale associato a tessuto linfoide della mucosa (MALT)</li> <li>• Linfoma a grandi cellule ( a cellule B, immunoblastico, diffuso clivato, diffuso non clivato, timico, intravascolare)</li> <li>• Linfoma di Burkitt</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Cellule T</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfoma linfoblastico</li> <li>• Linfoma cutaneo (epiteliotropo e non epiteliotropo)</li> <li>• Linfoma extranodale periferico</li> <li>• Linfoma angioimmunoblastico</li> <li>• Linfoma angiotropo (angiocentrico e angioinvasivo)</li> <li>• Linfoma intestinale</li> <li>• Linfoma anaplastico a grandi cellule</li> </ul>

## 1.4 SINTOMATOLOGIA CLINICA

I sintomi clinici associati al linfoma canino sono molto variabili e dipendono dalla sede d'insorgenza e dall'estensione della neoplasia<sup>147</sup>. Nel precedente capitolo venivano descritte brevemente le quattro principali localizzazioni anatomiche della malattia; ne analizziamo adesso le caratteristiche cliniche.

**Forma multicentrica:** è la più comune nel cane (80-85% dei casi) ed è caratterizzata da una linfadenopatia generalizzata non dolente, da un coinvolgimento epatico, splenico, del midollo osseo o da una combinazione di essi<sup>28</sup>. La linfadenomegalia spesso appare bilaterale e simmetrica, con linfonodi notevolmente ingrossati (superano da 5 a 15 volte le normali dimensioni). Nelle fasi iniziali lo stato proliferativo è asintomatico e non è infrequente che il rilevamento della linfadenomegalia avvenga casualmente: spesso i proprietari notano una o più masse sottocutanee accarezzando il proprio animale (i linfonodi ingrossati appunto) e così richiedono assistenza veterinaria<sup>28,41</sup>. A volte i motivi della visita sono riconducibili a segni aspecifici (presenti nel 20-40% dei casi) quali dimagrimento, anoressia, astenia, febbre, debolezza muscolare e talvolta disfagia causata dall'ingrossamento eccessivo dei linfonodi sottomandibolari o edema da stasi nel deflusso della linfa<sup>33,45,66</sup>. Segni clinici più comuni sono l'epato-splenomegalia e la distensione addominale mentre la poliuria-polidipsia può comparire secondariamente a ipercalcemia paraneoplastica<sup>31,145</sup>.

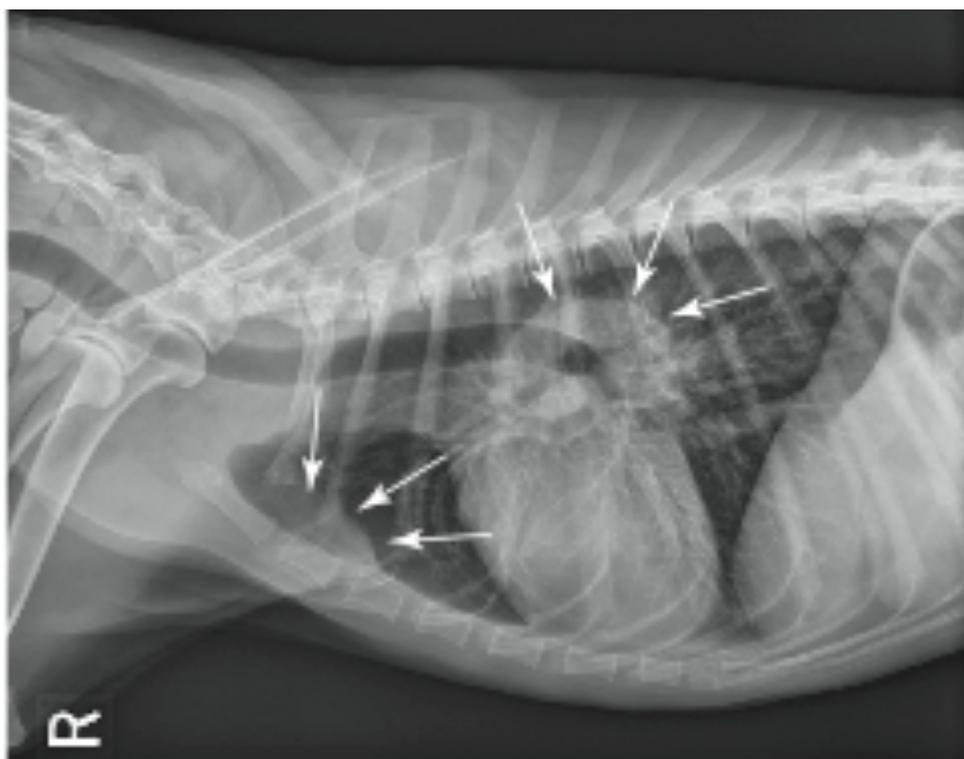


***Figura 1.4-1 Linfadenomegalia sottomandibolare in un cane con linfoma multicentrico (ripreso da 145 e modificato)***

**Forma alimentare:** questa forma rappresenta il 5-7% dei casi con coinvolgimento decrescente di piccolo intestino, fegato, linfonodi regionali, stomaco e colon. In alcuni pazienti il tratto gastroenterico è coinvolto secondariamente in corso di neoplasia multicentrica ma in questi soggetti la sintomatologia gastroenterica non è quella prevalente. La proliferazione linfomatosa può avvenire in forma di noduli murali (che coinvolgono mucosa e sottomucosa) o come infiltrazione diffusa<sup>14</sup>. Il linfoma intestinale colpisce pazienti con età media di 6,7 e 7,7 anni nei due studi retrospettivi con il maggior numero di casi<sup>27,30</sup>. Le razze più colpite sono Boxer, Shar pei e Golden retriever ed in alcuni studi viene evidenziata la maggiore prevalenza di cani maschi<sup>14,27,30,131</sup>. I segni clinici più comuni sono vomito, diarrea, anoressia, perdita di peso, malassorbimento, ittero e tenesmo<sup>27</sup>; questi, secondo l'esperienza di alcuni autori, sono gravi e persistenti con un

dimagrimento marcato e in tempi brevi<sup>14,38</sup>. La visita clinica di questi soggetti può evidenziare la presenza di masse addominali (rappresentate per esempio dai linfonodi mesenterici ingrossati o da masse a localizzazione intestinale) o anse intestinali ispessite. Talvolta possono comparire sintomi riferibili a ostruzione intestinale o peritonite (per rottura della massa linfomatosa). La prognosi nel cane è infausta: diversi studi clinici hanno rivelato una scarsa risposta alla chemioterapia e un tempo di sopravvivenza medio molto basso<sup>27,38</sup>.

**Forma mediastinica:** è piuttosto rara e i reperti patologici sono quasi sempre localizzati in cavità toracica con ipertrofia dei linfonodi mediastinici e/o del timo. Questi soggetti sono sottoposti all'attenzione del veterinario per l'improvvisa comparsa di dispnea, tosse, rigurgito e poliuria-polidipsia quando è presente ipercalcemia paraneoplastica (40% dei casi)<sup>28,120</sup>. La sintomatologia respiratoria e gastroenterica è dovuta alla compressione esercitata dai linfonodi mediastinici craniali sebbene un importante versamento pleurico possa contribuire ad aggravarla<sup>28,33</sup>. La massa mediastinica inoltre può comprimere la vena cava craniale causando la sindrome della vena cava con edema della testa e degli arti anteriori. All'esame fisico le anomalie sono generalmente confinate alla cavità toracica con diminuzione del normale murmure vescicolare, spostamento della normale sonorità polmonare nelle aree dorso-caudali quindi suono ottuso alla percussione nelle parti più ventrali<sup>66,75</sup>.



**Figura 1.4.2: Radiografia latero-laterale di un cane con aumento del linfonodo sternale e del tracheobronchiale mediano (ripreso da 147 e modificato)**

**Siti extranodali:** il linfoma cutaneo epiteliotropo rappresenta una delle forme extranodali più comuni e si divide in reticulosi pagetoide, sindrome di Sézary e micosi fungoide (la manifestazione più comune). I segni clinici sono molto variabili e possono mimare qualsiasi lesione cutanea primaria o secondaria. Per micosi fungoide si intende una forma di linfoma cutaneo non leucemico, più frequentemente riconosciuta nel cane (soggetti anziani, 9-11 anni); i cani possono presentare eritroderma pruriginoso esfoliativo, placche o noduli cutanei multipli con tendenza all'ulcerazione, depigmentazione mucocutanea o lesioni infiltrative ed ulcerative localizzate esclusivamente nel cavo orale. Una lesione caratteristica del cane è una neoformazione dermoepiteliale, circolare, in rilievo (a forma di ciambella), eritematosa e priva di peli che delimita un'area di cute normale<sup>28,39,75,142</sup>. La sindrome di Sézary è molto rara e rappresenta la

fase leucemica della micosi fungoide. E' caratterizzata da eritroderma esfoliativo, prurito ma soprattutto da linfadenomegalia generalizzata e presenza di cellule di Sézary (linfociti neoplastici) nell'infiltrato cutaneo e nel sangue. La reticulosi pagetoide è una forma benigna a decorso cronico che si presenta con due aspetti clinici: localizzata (Woringer-Kolopp) e generalizzata (Ketron-Goodman); quest'ultima è la più frequente nel cane e si presenta con papule e placche eritematose, ulcere a livello di giunzioni muco-cutanee, cavo orale, cuscinetto plantare e addome<sup>39,75</sup>. Il linfoma cutaneo non epiteliotropo è meno comune nel cane rispetto al gatto ed è caratterizzato da un immunofenotipo B; esso interessa derma e sottocute, senza coinvolgimento epidermico. Le lesioni sono multifocali e appaiono come noduli duri, a volte alopecici e di colore rosso-porpora<sup>75</sup>.



***Figura 1.4.3: linfoma epiteliotropo; presenza di papule eritematose e noduli multipli sull'addome di un cane (ripreso da 23 e modificato)***

## 1.5 DIAGNOSI

La diagnosi di linfoma si basa inizialmente su un'accurata visita clinica che includa la palpazione di tutti i linfonodi esplorabili in modo da poterne rilevare l'eventuale megalia. La diagnosi differenziale della linfadenomegalia deve essere posta con malattie infettive batteriche, virali, parassitarie (soprattutto con *Leishmaniosi* o *Babesiosi*), fungine o rickettsie (*Ehrlichia canis*); sono da prendere in considerazione anche disordini immunomediati (Lupus eritematoso sistemico, poliartriti, vasculiti e dermatopatie) o altre neoplasie emopoietiche (leucemia linfoide, mieloma multiplo o istiocitosi maligna). Il clinico inoltre deve esaminare le mucose per evidenziare la presenza di pallore o petecchie (indicativi di anemia o trombocitopenia) e palpare l'addome per mettere in risalto un'eventuale organomegalia, ispessimento della parete addominale o linfadenopatia addominale<sup>26,144</sup>. Un dato che dev'essere valutato con attenzione è l'anamnesi; nei pazienti affetti da linfoma alimentare l'anamnesi remota non riporta segni clinici gastroenterici oppure ne riporta di saltuari e poco rilevanti. La diagnosi differenziale principale deve essere posta con IBD (*inflammatory bowel disease*). In corso di malattia infiammatoria intestinale generalmente il proprietario riferisce di segni clinici altalenanti e responsivi, anche per lunghi periodi, alla terapia sintomatica. Nei pazienti affetti da linfoma alimentare invece l'insorgenza dei segni clinici risale al massimo alle 6-8 settimane precedenti alla visita e il proprietario riferisce di sintomi progressivi, poco responsivi alla terapia sintomatica o aggravatesi rapidamente<sup>14</sup>. Altre possibili diagnosi differenziali sono neoplasie intestinali non linfomatose o corpi estranei<sup>26</sup>.

### 1.5.1 DIAGNOSI DI LABORATORIO

Gli esami laboratoristici di routine includono emogramma, profilo biochimico ed esame delle urine; questi raramente forniscono indicazioni specifiche per la diagnosi ma possono far sospettare un linfoma o essere d'aiuto nell'interpretazione dell'esame citologico<sup>66</sup>. Nella maggior parte dei casi l'esame emocromocitometrico evidenzia anemia normocitica normocromica (circa 40% dei casi), lieve e non rigenerativa<sup>45,67</sup>; l'anemia può essere la conseguenza di un processo immunomediato, di un'infiltrazione midollare o della cronicità della malattia (a causa di un processo infiammatorio cronico, anomalie nel metabolismo del ferro o mancata risposta del midollo osseo all'eritropoietina)<sup>136</sup>. La trombocitopenia è altrettanto frequente, verificandosi nel 30-50% dei casi e può avere anch'essa un'origine immunomediata o essere secondaria a mielottosi<sup>95,136</sup>. Insieme all'anemia, secondo alcuni studi, i riscontri ematologici più frequenti risultano essere la linfocitosi (circa 20% dei casi) e la neutrofilia (25-45% dei casi, diretta conseguenza di un danno tissutale o di processi necrotici dovuti all'infiltrazione di cellule linfomatose in organi o tessuti); meno frequente la linfopenia (7-12% dei casi)<sup>45,67,136</sup>.

L'ipercalcemia (>12mg/dl, spesso associata a linfomi T) rappresenta una sindrome paraneoplastica di particolare rilevanza prognostica nei cani affetti da linfoma, manifestandosi nel 20-40% dei pazienti. La causa più probabile sembra imputabile al rilascio, da parte delle cellule tumorali, di fattori umorali PTH-simili (PTH-related protein, PTHrp) con conseguente attività osteoclastica e aumentato assorbimento di calcio a livello renale<sup>28,132</sup>. Diversi segni clinici sono ascrivibili a questa anomalia biochimica: debolezza muscolare, anoressia, perdita di peso, letargia, vomito e soprattutto poliuria-polidipsia (il calcio ionico

antagonizza gli effetti dell'ormone antidiuretico sul tubulo distale e sul dotto collettore, alterando così il meccanismo di concentrazione delle urine)<sup>95</sup>.

L'iperproteinemia rappresenta un'altra alterazione paraneoplastica di raro riscontro in cani e gatti con linfoma; essa può dipendere dalla produzione di immunoglobuline da parte delle cellule neoplastiche di immunofenotipo B (circa 6% dei cani con linfoma mostra gammopatia monoclonale)<sup>28,75</sup>.

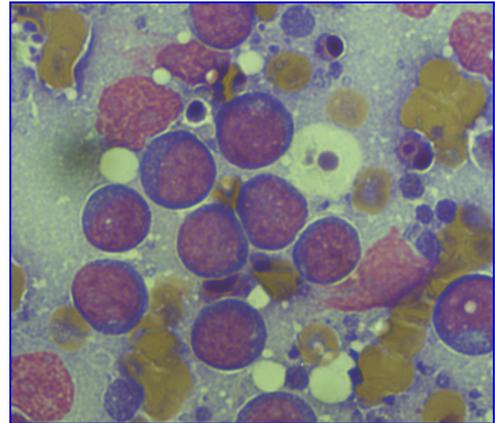
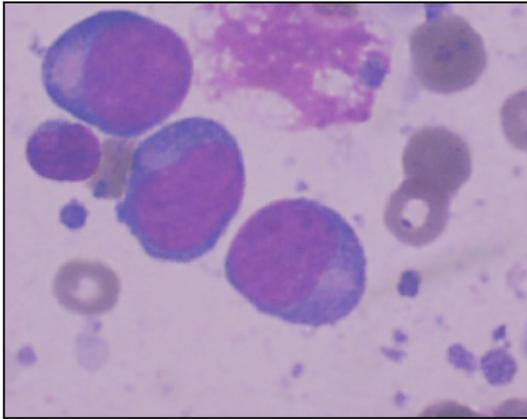
A seconda degli organi coinvolti inoltre possiamo osservare aumento di bilirubina, enzimi epatici (compreso LDH, che può fungere da marker di recidiva<sup>73</sup>), urea e creatinina (aumentate per danno renale conseguente all'infiltrazione neoplastica o all'ipercalcemia)<sup>147</sup>.

L'ipoalbuminemia invece è uno dei parametri riscontrati più spesso in corso di linfoma gastrointestinale<sup>38</sup>.

### **1.5.2 ESAME CITOLOGICO**

L'ago aspirato dei linfonodi periferici rappresenta una tappa fondamentale del procedimento diagnostico, soprattutto in caso di linfoma multicentrico; questa tecnica è facile e veloce da eseguire, scevra da effetti collaterali e diagnostica nella maggioranza dei casi<sup>75</sup>. I campioni citologici indicativi di linfoma evidenziano una popolazione di cellule linfoide immature, predominano le forme ad intermedio-alto grado di malignità e i tipi cellulari più comuni sono il linfoma centroblastico<sup>151</sup> (monomorfo e polimorfo) e il linfoma immunoblastico<sup>35,45,98</sup>. Si devono valutare le dimensioni cellulari, forma nucleare, aspetto della cromatina, forma e numero dei nucleoli, quantità e basofilia citoplasmatiche, eventuale presenza di vacuoli e granuli e indice mitotico. La taglia cellulare si stabilisce paragonando la

grandezza del nucleo a quella di un eritrocita. Le cellule sono considerate piccole quando il loro nucleo è di taglia  $<$  a 2 emazie, medie se è  $=$ , grande se è  $>$ . Si valuta poi il nucleo, osservandone la forma che può essere rotonda, ovale, a fagiolo, irregolare con incisure, ecc.; l'aspetto della cromatina (fine, decondensata, addensata in maniera irregolare con rinforzamenti in prossimità della membrana nucleare o dei nucleoli, ecc.); infine i nucleoli (numero, dimensioni e localizzazione). Si osserva poi il citoplasma ponendo attenzione alla sua ampiezza, basofilia e agli eventuali contenuti (vacuoli, granulazioni, elementi cellulari fagocitati). In presenza di numerosi macrofagi in fagocitosi, il campione citologico assume l'aspetto "a cielo stellato" (o "starry sky"), facilmente riscontrabile in linfomi linfoblastici, immunoblastici e di burkitt. La presenza dello starry sky è correlata all'aggressività del linfoma; i macrofagi, infatti, hanno il compito di fagocitare le cellule che muoiono e nei linfomi aggressivi il turnover cellulare è notevolmente aumentato. Si passa poi alla valutazione dell'indice mitotico: si contano 10 campi con obiettivo 40x e se si hanno  $<$  2 mitosi/campo l'indice mitotico è considerato basso, se compreso tra 3 e 5 è medio, se  $>$  di 6 è alto. Se i risultati ottenuti con il puntato linfonodale non sono sufficienti alla tipizzazione del linfoma è necessario ricorrere all'esame istologico, tramite un'exeresi chirurgica dell'intero linfonodo<sup>142</sup>.



*Figura 1.5.2-1-2 esempi linfoma centroblastico polimorfo (esame citologico eseguito presso l'Ospedale Didattico "M.Modenato")*

### **1.5.3 IMMUNOFENOTIPO**

L'identificazione della classe linfocitaria interessata dal processo neoplastico non si basa solo su criteri cito-morfologici. Un metodo molto preciso di riconoscimento è quello dell'immunofenotipizzazione, la quale rappresenta un fattore prognostico necessario per la previsione del comportamento biologico della malattia. La metodica prevede l'utilizzo di anticorpi monoclonali grazie ai quali è possibile determinare alcune molecole di membrana specifiche, la cui espressione è ben riconosciuta in differenti tipi cellulari o in specifici stadi di differenziazione e attivazione. Tra i numerosi antigeni valutabili sono stati riconosciuti più di 200 cluster di differenziazione, identificati dalla sigla CD seguita da un numero. Gli anticorpi utilizzati nel cane sono quelli che riconoscono le molecole dei linfociti B (CD79a, CD21, le immunoglobuline di superficie e citoplasmatiche) e dei linfociti T (CD3, CD4, CD5, CD8). Un linfoma sarà di fenotipo T quando risulterà CD3+, CD79a-, CD21-, cIg/sIg- e potrà essere positivo anche per altre molecole quali il CD4, CD8, CD5. Un linfoma sarà di fenotipo B quando invece risulterà CD3-, CD4-, CD8-, CD79a+, CD21+, cIg/sIg+.

Ki67 invece rappresenta l'antigene di proliferazione e indica se la cellula ha intrapreso il ciclo cellulare. Questo è riconosciuto dall'anticorpo mib-1<sup>142,147</sup>. Le tecniche di immunofenotipizzazione comprendono immunoistochimica, immunocitochimica, citometria a flusso o analisi clonale mediante PCR<sup>28</sup>.

## **1.6 STADIO CLINICO**

Dopo aver confermato la diagnosi di linfoma, la prassi corretta prevede che la neoplasia venga stadiata. La stadiazione rappresenta la valutazione dell'estensione anatomica di una neoplasia e permette di definire in modo standardizzato quanto essa sia voluminosa e diffusa al momento della diagnosi. La stadiazione inoltre è in grado di fornire informazioni utili per definire una probabile prognosi e per impostare un protocollo terapeutico adeguato<sup>79</sup>. Come già citato precedentemente, esiste un sistema di classificazione messo a punto dall'organizzazione mondiale della sanità e suddiviso in cinque stadi e due sottostadi. Questo sistema (derivato dal metodo TNM per la valutazione delle neoplasie umane) si avvale delle informazioni cliniche e clinico-patologiche raccolte per determinare l'estensione della malattia quindi correlarla alla prognosi<sup>28</sup>.

Le indagini strumentali sono fondamentali nel processo di stadiazione: radiografia ed ecografia in combinazione spesso risultano sufficienti per stadiare i pazienti con linfoma<sup>144</sup>. Lo studio radiografico del torace va valutato per ricercare linfadenopatia sternale e/o tracheobronchiale, infiltrati polmonari di tipo interstiziale diffuso e versamento pleurico. Da importanti studi è stato visto che il 60-75% dei cani con linfoma multicentrico presentava coinvolgimento

polmonare al momento della diagnosi. I rilievi radiografici addominali (presenti in circa 50% dei pazienti con linfoma multicentrico) possono includere: epato-splenomegalia, linfadenomegalia (sottolombare e mesenterica) e versamento addominale<sup>12,129</sup>. L'ecografia consente di esplorare accuratamente alcune stazioni linfonodali ed è utile per studiare fegato, reni, vescica e milza (caratteristico aspetto a "nido d'ape" con piccole aree ipoecogene diffuse in tutto il parenchima)<sup>18,144</sup>. Questa tipologia d'esame inoltre, in corso di linfoma alimentare, può mettere in evidenza un aumento dello spessore della parete intestinale, masse o ispessimenti localizzati e perdita della stratigrafia; nei casi in cui siano presenti tali alterazioni l'iter diagnostico prevede l'esecuzione di un prelievo biotico a tutto spessore nei siti interessati mediante laparoscopia o laparotomia<sup>14</sup>.

L'esame del midollo osseo permette di completare il processo di stadiazione ed è indicato in soggetti con alterazioni ematologiche (anemia, linfocitosi, citopenie periferiche)<sup>147</sup>. Il riscontro di forme leucemiche è strettamente correlato alle tecniche diagnostiche utilizzate: la biopsia midollare a core è in grado di svelare il 57% dei casi, contro il 34% dell'aspirato e il 28% dello striscio di sangue periferico. In queste forme leucemiche si può osservare la presenza in circolo di linfoblasti, prolinfociti o linfociti immaturi<sup>111,152</sup>.

## **1.7 FATTORI PROGNOSTICI**

La prognosi è molto variabile e dipende da numerosi fattori. La guarigione è molto rara (< 10% dei casi)<sup>147</sup> tuttavia il linfoma rappresenta una delle neoplasie più chemioresponsive e l'obiettivo del veterinario dev'essere quello di indurre una remissione della malattia

quindi prolungare e migliorare la qualità di vita dell'animale. I fattori prognostici maggiormente coinvolti risultano essere lo stadio clinico, la morfologia cellulare, il grado istologico e l'immunofenotipo. Grazie a studi recenti, il migliore inquadramento istopatologico ha consentito di delineare il comportamento biologico della malattia, dimostrando quanto sia importante riconoscere il sottotipo senza fermarsi a diagnosi generica di linfoma e immunofenotipizzazione<sup>75,147</sup>. Il sottotipo istologico sembra avere dunque un importante valore prognostico ai fini della remissione completa, della durata della prima remissione e della sopravvivenza totale. Secondo studi molto recenti il linfoma T linfoblastico e il linfoma della zona mantellare sono molto aggressivi e associati ad una prognosi infausta con tempi di sopravvivenza molto brevi<sup>75,150</sup>. Dal punto di vista morfologico un linfoma ad alto grado di malignità (centroblastico o immunoblastico) sarà chemioresponsivo ma avrà una durata della prima remissione più breve e una prognosi peggiore rispetto a uno a basso grado di malignità<sup>74,108,134</sup>. Come già accennato in precedenza, l'immunofenotipo T risulta essere quello a prognosi più sfavorevole<sup>50,74,108,134</sup>; secondo Teske<sup>134</sup> sono tutti ad alto grado di malignità mentre in uno studio di Fournel (1997)<sup>40</sup> emergeva una prevalenza di linfomi T a basso grado di malignità.

Lo stadio clinico rappresenta un fattore prognostico molto dibattuto: molti studi concordano sul fatto che cani con linfoma ai primi stadi (I-III) hanno una prognosi migliore rispetto a quelli al IV-V stadio. I tempi di sopravvivenza inoltre sono ridotti in quei soggetti che mostrano segni clinici quali febbre, depressione, sintomi gastroenterici o citopenie periferiche<sup>50,57,134,142</sup>; l'anemia e l'infiammazione cronica

sono reperti clinici associati, in molti lavori, ad un minor tempo di sopravvivenza totale<sup>8,45,63,90</sup>.

Secondo uno studio recente, la presenza alla diagnosi di alcune variabili (stadio clinico I-IV, assenza di ipercalcemia, nessun pretrattamento con corticosteroidi, ematocrito maggiore di 35%, peso corporeo maggiore di 10kg, linfoma centroblastico, immunofenotipo B, assenza di infiltrazione midollare) permetteva di identificare cani con linfoma che avrebbero vissuto oltre due anni<sup>74</sup>.

Per quanto riguarda la localizzazione anatomica, fattori prognostici sfavorevoli sono il coinvolgimento primariamente cutaneo, mediastinico e gastrointestinale diffuso. La prognosi del linfoma intestinale nel cane è decisamente infausta: in due studi la sopravvivenza mediana era, rispettivamente, di 13 e 77 giorni<sup>38,114</sup>. Nel lavoro di Rassnick, fattori prognostici negativi erano la presenza di diarrea e la mancata remissione dei sintomi in seguito alla terapia<sup>114</sup>. Un dato interessante rilevato in due studi è che il linfoma alimentare a sede colica o rettale ha una prognosi decisamente migliore<sup>27,38</sup>.

L'indice di proliferazione rappresenta un fattore molto complesso. Si valuta mediante l'indice mitotico, l'indice Ki-67, la quantità di AgNORs (Argyrophyl Nucleolar Organizer regions), l'espressione della PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) e il tempo potenziale di raddoppiamento del tumore. Ad oggi esistono studi contrastanti in merito al loro valore prognostico<sup>63,106,143</sup>.

In diverse neoplasie animali tra cui il linfoma, la resistenza ai farmaci antitumorali è associata ad una sovraespressione della glicoproteina P (P-gp) con conseguente MDR (chemioresistenza multipla, Multi Drug Resistance). La P-gp è una glicoproteina di membrana fisiologicamente collocata in organi deputati al metabolismo dei farmaci; essa agisce

come pompa in grado di estrarre dalla cellula farmaci antitumorali e quindi indurre lo sviluppo di chemioresistenza<sup>87</sup>. I glucocorticoidi, essendo potenti induttori di P-gp, sono capaci di indurre chemioresistenza in cani con linfoma, se somministrati prima della chemioterapia; alcuni studi evidenziano dunque una correlazione fra l'uso prolungato di glucocorticoidi e un minor tempo di sopravvivenza nei cani affetti da questa emopatia<sup>45,109</sup>.

I principali fattori epidemiologici riguardano l'età e il sesso dell'animale. Attualmente sembra non esserci alcuna relazione significativa tra l'età e la risposta alla terapia e/o alla durata di prima remissione e/o alla sopravvivenza totale<sup>142</sup>. In alcuni studi il sesso sembra essere un fattore prognostico rilevante e le femmine sterilizzate sembrano avere una prognosi migliore<sup>62,68</sup>. Un'ipotesi è che ciò sia dovuto all'incidenza degli ormoni sessuali sulle modalità di crescita cellulare e sulla differenziazione dei linfociti; tuttavia non è stata dimostrata la presenza di recettori per estrogeni e testosterone né sui linfociti normali né sulle cellule neoplastiche dei cani colpiti da linfoma<sup>152,156</sup>.

Altri marker prognostici riportati in letteratura sono l'ipocobalaminemia<sup>25</sup>, e l'ipercalcemia (presente in linfomi T e spesso descritta in letteratura)<sup>50,120</sup>, la concentrazione ematica di glutatione S transferasi<sup>53</sup>, proteina C reattiva<sup>99</sup> e lattato deidrogenasi (LDH)<sup>73,160</sup>. La valutazione seriale di LDH può anticipare la recidiva in cani con linfoma; secondo uno studio recente se i livelli di LDH sono aumentati al termine della chemioterapia e 30 giorni dopo, tendenzialmente i cani tendono a recidivare entro 45 giorni<sup>73</sup>.

E' importante prendere in considerazione anche i fattori strettamente connessi al proprietario, il quale potrà essere influenzato dai costi

dell'eventuale terapia o dalla disponibilità a condurre l'animale alla visita medica di controllo e per questo dovrà essere adeguatamente motivato dal veterinario stesso. Il linfoma resta una patologia molto aggressiva e l'esito finale sarà comunque la morte del soggetto: il veterinario e il proprietario possono però decidere di allungare la vita dell'animale e di migliorarla qualitativamente. La prognosi del linfoma infatti migliora notevolmente in animali trattati e varia anche in funzione dell'efficacia della chemioterapia: in questo senso il veterinario rappresenta un fattore determinante proprio in base alla sua esperienza professionale e terapeutica<sup>66,152</sup>.

## **2 LA TERAPIA**

Il linfoma rappresenta una sfida terapeutica per il veterinario il quale dovrà esporre al proprietario le eventuali opzioni terapeutiche ed essere chiaro fin da subito circa la prognosi: la maggior parte dei soggetti infatti svilupperà una recidiva e meno del 10% di loro sarà in grado di guarire del tutto<sup>74,79</sup>

Trattandosi di una neoplasia sistemica, il pilastro terapeutico è rappresentato dalla chemioterapia con lo scopo di indurre una remissione duratura al fine di migliorare la qualità di vita dei pazienti e, possibilmente, di prolungarne la sopravvivenza. Senza alcuna terapia (oppure somministrando soltanto corticosteroidi) la sopravvivenza non supera le 4-6 settimane<sup>147</sup>. Secondo diversi lavori<sup>43,45,55</sup> le percentuali di remissione in seguito a un protocollo chemioterapico di induzione iniziale si aggirano intorno all'80-90% nei cani con un'aspettativa media di vita di circa 12 mesi, anche se sono riportati

tempi di sopravvivenza maggiori di 2 anni<sup>74</sup>. La scelta terapeutica dipende da numerosi fattori tra cui stadio clinico, grado istologico, presenza di sindromi paraneoplastiche, esperienza personale del veterinario e, non ultimo, impegno economico e temporale da parte del proprietario<sup>75</sup>.

## **2.1 PRINCIPI DI CHEMIOTERAPIA**

L'utilizzo efficace dei chemioterapici richiede un'approfondita conoscenza di principi di biologia oncologica, cinetica cellulare, farmacologia e farmacoresistenza.

Le cellule neoplastiche si differenziano da quelle normali a seguito di specifiche proprietà: capacità di replicazione incontrollata, invasività e capacità metastatica. In caso di neoplasia viene a mancare la regolazione del ciclo cellulare: le cellule neoplastiche non subiscono i normali meccanismi di controllo che regolano la crescita di cellule sane. Durante la differenziazione di organi e tessuti, inoltre, le cellule normali sviluppano rapporti sequenziali con le cellule adiacenti mentre quelle tumorali crescono invadendo i tessuti adiacenti e sono capaci di colonizzare i tessuti a distanza, dando origine a focolai metastatici<sup>72</sup>.

Le variabili più influenti sulla terapia antitumorale sono il ciclo cellulare e la cinetica di crescita della neoplasia. Il ciclo cellulare si compone di diverse fasi: mitosi (fase M), sintesi di RNA e proteine ( $G_1$  e  $G_2$ ), sintesi del DNA (fase S, che ha luogo fra  $G_1$  e  $G_2$ ) e fase di quiescenza ( $G_0$ ). Le cellule in attiva moltiplicazione (fasi  $G_1$ ,  $G_2$ , S e M) rispondono al trattamento chemioterapico e mostrano una maggiore affinità agli agenti antitumorali rispetto alle cellule in stato di

quiescenza; quest'ultime sono maggiormente refrattarie alla terapia e rappresentano una riserva di cellule neoplastiche dalla quale la neoplasia può rigenerare<sup>118</sup>.

### **2.1.1 MODELLI DI CRESCITA NEOPLASTICA**

Le curve di crescita descrivono come si muove nel tempo la popolazione neoplastica, in funzione di eventuali agenti esterni (per esempio la somministrazione di chemioterapici). Le leggi di Skipper sono applicate ai tumori dotati di crescita esponenziale, che nelle fasi iniziali possono essere trattati con la chemioterapia. Le cellule neoplastiche che mostrano crescita logaritmica continuano a dividersi senza mai entrare in fase  $G_0$ , raddoppiando di numero a un tasso specifico. Per crescita esponenziale dunque si intende una crescita con costante tempo di raddoppiamento. In accordo con la seconda legge di Skipper (o modello di log kill) gli agenti chemioterapici esplicano la loro attività citoriduttiva secondo una cinetica di primo ordine: ad ogni ciclo non viene uccisa una quota assoluta di cellule tumorali, ma una percentuale costante. Questo è il motivo per il quale la chemioterapia tende a essere più efficace durante i primi cicli e per ridurre ulteriormente il numero di cellule neoplastiche è necessario sottoporre il paziente a successivi cicli di trattamento fino alla completa eradicazione della popolazione tumorale. Nell'intervallo inter-somministrazione, inoltre, non si deve verificare crescita neoplastica o ripopolamento. Da ciò si evince che maggiore sarà la dose di chemioterapico somministrato, maggiore sarà la frazione di cellule neoplastiche uccise.

Il razionale scientifico che regola il concetto moderno di chemioterapia è costruito sul principio dei log kill multipli: se si utilizzano più farmaci

contemporaneamente e in strategie combinate, i loro log kill si sommano, diventando multipli. L'ipotesi dell'uccisione cellulare però è vera solo a determinate condizioni: il modello di Skipper è troppo semplicistico e soffre di diversi limiti clinicamente rilevanti; i tumori costituiti da popolazioni cellulari eterogenee non raddoppiano di volume a velocità costante e questa legge può essere associata soltanto al compartimento neoplastico costituito da pool proliferativo (cellule mitoticamente attive). La neoplasia, infatti, possiede una frazione in accrescimento, una frazione quiescente (in seguito a stimoli mitogeni le cellule possono essere reclutate a rientrare nel ciclo cellulare) e una frazione statica (le cellule neoplastiche hanno perso capacità proliferativa e contribuiscono solo al volume tumorale). I tumori con breve tempo di raddoppiamento sono maggiormente chemioresponsivi mentre quelli con un tempo di raddoppiamento lungo sono chemioresistenti e non sottostanno alle leggi di Skipper. Questo modello così non tiene conto della chemioresistenza dal momento che non tutte le cellule sono sensibili in egual modo alla chemioterapia e, una volta eradicato tutte le cellule chemiosensibili, le cellule refrattarie daranno origine a recidiva chemioresistente<sup>72</sup>.

I tumori solidi, eterogenei, tipicamente stanno al modello di crescita gompertziana, caratterizzato da proliferazione con decremento di crescita in funzione del tempo. Secondo Gompertz il tumore ha, nelle fasi iniziali, una elevata frazione di accrescimento e mostra una curva di crescita rapida; secondariamente, quando ha raggiunto notevoli dimensioni, la crescita rallenta e la curva si appiattisce: i processi di vascolarizzazione non garantiscono più un apporto di ossigeno adeguato e le cellule al centro della neoplasia diventano ipossiche, andando incontro a necrosi. In questo modo si equilibrano tasso di

crescita e tasso di morte e il tumore non aumenta di dimensione. La tesi di Gompertz assume dunque che le cellule neoplastiche sono eterogenee da un punto di vista replicativo e che, in un determinato momento, si trovano in diverse fasi del ciclo cellulare; con il rallentare del ciclo cellulare, alcune cellule lasciano il pool proliferativo ed entrano in G<sub>0</sub>, diventando meno sensibili alla chemioterapia (implicazione terapeutica importante): le leggi di Skipper così non possono più essere applicate. Il trattamento chemioterapico però è in grado di alterare le fasi del ciclo cellulare: le cellule chemiosensibili muoiono, diminuendo la densità nelle zone centrali del tumore così le cellule che in questa sede erano statiche ricominciano a ciclare e a ridiventare sensibili alla chemioterapia. Durante la terapia dunque si riduce il volume neoplastico e di conseguenza migliora la vascolarizzazione, determinando ripresa dell'attività ciclante da parte delle cellule quiescenti (che tornano ad essere chemiosensibili). Il modello gompertziano ha tuttavia dei limiti in quanto non prevede un intervallo quiescente temporaneo (in cui le cellule non crescono né muoiono) né l'insorgenza di chemioresistenza<sup>72</sup>.

### **2.1.2 LA CHEMIORESISTENZA DELLE CELLULE NEOPLASTICHE**

Uno dei principali problemi legati all'utilizzo di antitumorali consiste nella rapida insorgenza di fenomeni di chemioresistenza, ossia della capacità delle cellule neoplastiche di sopravvivere agli effetti di un chemioterapico normalmente efficace. Il fenomeno è ascrivibile a una combinazione di fattori individuali riguardanti la cinetica e le caratteristiche ambientali a livello di massa tumorale quindi la biologia delle cellule tumorali stesse<sup>118</sup>. Le cellule neoplastiche sono molto efficienti nell'utilizzare questi meccanismi di resistenza per

proteggersi. Le neoplasie possono avere una resistenza intrinseca o sviluppare una resistenza acquisita; la capacità di acquisire farmacoresistenza non rappresenta un evento tardivo in corso di cancerogenesi bensì fa parte dei processi iniziali e può essere addirittura presente prima dell'insorgenza clinica del tumore. La resistenza acquisita insorge dunque in seguito a esposizione di cellule neoplastiche a farmaci citotossici; l'oncologo medico, al fine di scongiurare questa evenienza, dovrà trattare i pazienti il prima possibile dopo la diagnosi, applicare dosi raccomandate e protocolli chemioterapici standardizzati (e pubblicati in letteratura), non utilizzare prednisone prima che sia stata accertata la diagnosi<sup>87</sup> quindi trattare le recidive con un protocollo di seconda linea adeguato.

I meccanismi implicati nella resistenza acquisita sono:

- Resistenza mediata da trasporto: ridotta assunzione del farmaco da parte delle cellule tumorali o aumentata eliminazione di esso (la glicoproteina P può mediare questo meccanismo).
- Resistenza metabolica: ridotta attivazione di agenti somministrati come pro-farmaci (ciclofosfamide) o aumentata inattivazione (citosina arabinoside o agenti antimetaboliti).
- Resistenza al target: alterazione del bersaglio o alterata affinità.
- Riparazione di DNA danneggiato: nel caso di agenti alchilanti e cisplatino.
- Evasione dai processi apoptotici: la maggior parte dei chemioterapici uccide le cellule neoplastiche, forzandole ad andare incontro ad apoptosi. Sono coinvolti in tale meccanismo Bcl-2, p53, p21 e p27<sup>76</sup>.

Un meccanismo particolarmente studiato è quello della farmacoresistenza multipla (MDR, Multi Drug Resistance) indotta dalla

presenza di trasportatori in grado di ridurre le concentrazioni cellulari di vari chemioterapici<sup>5,49,87,153</sup>. Come già accennato, questo meccanismo può essere mediato dalla glicoproteina P (P-gp), una proteina transmembrana sovraespressa in alcune neoplasie. Questa proteina, codificata dal gene *mdr-1* (o *ABCB1*), rappresenta una pompa di efflusso ATP-dipendente ed è fisiologicamente esposta sulla superficie luminale di organi deputati ad assorbimento, distribuzione ed escrezione di farmaci. Il suo compito è di proteggere la cellula da accumuli eccessivi di tossine endogene o esogene: le cellule tumorali, grazie alla sovraespressione di P-gp, possono resistere al chemioterapico riducendone l'accumulo intracellulare. Uno studio di Mealey e collaboratori (2002) ha dimostrato che una sottopopolazione di cani di razza Collie ha una glicoproteina P mutante e 35% di essi risulta omozigote per l'allele mutante di P-gp. Tale difetto si esplica in una insufficiente espressione di questa proteina e aumentata tossicità post-chemioterapia ma le cellule neoplastiche potrebbero non sviluppare il fenotipo di farmacoresistenza multipla mostrandosi maggiormente chemiosensibili<sup>85</sup>.

### **2.1.3 IL MODELLO DI GOLDIE-COLDMAN E LA FARMACORESISTENZA**

Le mutazioni genetiche che si verificano all'interno di una popolazione neoplastica sono clinicamente rilevanti in quanto sono all'origine della farmacoresistenza. La combinazione fra elevata produzione cellulare (o elevato tasso mitotico) ed elevata perdita cellulare porta a un elevato tasso mutazionale nell'unità di tempo. La crescita neoplastica, infatti, è solo parzialmente correlata all'attività proliferativa: essa dipende anche dalla perdita di cellule e tumori che mostrano

un'elevata perdita cellulare tendono ad avere tasso di crescita più basso rispetto ai tumori con tasso proliferativo simile ma più bassa frazione di perdita cellulare. L'ipotesi di Goldie-Coldman<sup>48</sup> è un modello matematico secondo il quale in una neoplasia si ha la formazione spontanea di cellule tumorali chemioresistenti in rapporto al numero di divisioni mitotiche; da ciò si evince che le possibilità di guarire da una neoplasia in seguito a trattamento chemioterapico diminuiscono con l'aumentare di volume del tumore stesso: la migliore strategia per sconfiggere il cancro è somministrare il trattamento il più precocemente possibile, quando ancora non si sono sviluppate le cellule chemioresistenti. Nella pratica clinica tale modello è difficile da applicare, sia perché spesso la diagnosi è tardiva, sia perché il momento critico (quando non si è ancora sviluppata la resistenza) è difficile da individuare.

E' ormai sufficientemente chiaro che per ottenere la massima attività antitumorale è necessario utilizzare più farmaci in strategie combinate o sequenziali. Il razionale di strategia chemioterapica combinata si basa sulle osservazioni di Goldie-Coldman che suggeriscono di usare quanti più chemioterapici possibili (con differenti meccanismi di resistenza) il più precocemente possibile. Secondo il modello di Norton-Simon, inoltre, la chemioterapia di induzione deve essere sufficientemente citoriduttiva al fine di diminuire il numero di cellule neoplastiche residue: la strategia migliore prevede la somministrazione di una dose elevata di farmaco nel più breve intervallo di tempo<sup>72,76</sup>.

Riassumendo, i principi guida formulati per combinare tra loro i vari chemioterapici sono i seguenti:

- Includere farmaci di comprovata efficacia sul tumore

- Includere farmaci con diversi meccanismi d'azione e con differenti meccanismi di resistenza
- Somministrare, in induzione, chemioterapici a dosaggi più elevati per diminuire la probabilità di chemioresistenza.

#### **2.1.4 CALCOLARE LA DOSE APPROPRIATA DI CHEMIOTERAPICO**

I farmaci antitumorali sono principi attivi con scarso indice terapeutico (rapporto fra tossicità ed efficacia di un farmaco), sono poco maneggevoli e la conseguenza di una piccola overdose può essere fatale per il paziente. Il dosaggio dei chemioterapici in base alla superficie corporea ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) permette di somministrare al paziente una dose più sicura, dal momento che la superficie corporea è meglio correlabile al grado di irrorazione sanguigna di organi quali fegato e rene, deputati alla metabolizzazione e detossificazione dei farmaci. In questo modo vengono eliminate le differenze di metabolismo basale, distribuzione, trasformazione ed eliminazione di un principio attivo che normalmente esistono tra cani di piccola e grande taglia. Il valore corrispondente al  $\text{m}^2$  si ottiene con la formula  $k \cdot \text{peso corporeo (kg)}^{0,66} / 10^4$  (k è una costante pari a 10.1 per il cane e 10 per il gatto)<sup>118</sup>.

#### **2.1.5 MODALITA' DI SOMMINISTRAZIONE DEI CHEMIOTERAPICI**

I chemioterapici possono essere somministrati per via orale, endovenosa, intrarteriosa, sottocutanea, intralesionale, intraincisionale, intracavitaria, intravescicale e inalatoria. Efficacia e tossicità spesso variano in base alla scelta della via di somministrazione ed errori tecnici, anche banali, possono

compromettere l'efficacia della terapia o accentuarne la tossicità. I chemioterapici usati nella terapia del linfoma canino sono somministrati per via orale e per via endovenosa. La via orale consente la somministrazione domiciliare da parte del proprietario, riducendo costi e tempo mentre per la via endovenosa bisogna considerare i tempi d'infusione: esistono farmaci la cui ottimale efficacia richiede somministrazione in bolo rapido (vincristina per esempio) mentre altri richiedono infusione endovenosa prolungata (doxorubicina). Questa modalità di somministrazione deve essere effettuata in strutture adeguate e da un personale qualificato al fine di scongiurare eventuali pericoli per il paziente, per il proprietario o per il personale stesso; nella ricostituzione e preparazione dei chemioterapici iniettabili è necessario evitare qualsiasi dispersione e/o aerosolizzazione delle sostanze. E' preferibile adibire una stanza a locale di preparazione (i locali in questione vanno identificati con appositi cartelli) con all'interno una cappa di sicurezza biologica di classe 2B o superiore. I requisiti minimi per la protezione del veterinario e del proprietario sono guanti e camice da chemioprotezione, maschera e occhiali. Per i farmaci endovenosi è necessario applicare al paziente un catetere periferico collegato a soluzione fisiologica 0.9%, prima e dopo l'iniezione del chemioterapico. Il sangue e tutti gli escreti di animali trattati sono una potenziale fonte di contaminazione per un tempo variabile e si devono applicare misure di sicurezza adeguate per la loro manipolazione<sup>78,103</sup>.

### **2.1.6 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA CHEMIOTERAPIA: CRITERI VCOG**

Il VCOG (Veterinary Cooperative Oncology Group) ha recentemente pubblicato alcuni criteri di valutazione in merito alla risposta del soggetto al trattamento chemioterapico; le norme presentate in questo lavoro sono un tentativo di standardizzare e comparare l'efficacia dei molteplici protocolli usati in medicina veterinaria. Queste linee guida sono valide solo per il linfoma multicentrico canino, dove la linfadenomegalia periferica rappresenta la lesione principale: gli autori precisano infatti che questo studio non valuta in modo critico le manifestazioni extra nodali (cutanee, gastroenteriche, del sistema nervoso centrale ecc...) ed è soltanto una versione iniziale di un sistema che è destinato ad evolversi nei lavori futuri<sup>146</sup>. I linfonodi sono classificati come misurabili se il diametro maggiore è superiore a 10 mm o non misurabili se sono inferiori a 10 mm mentre sono considerate non misurabili la presenza di ascite, versamento pleurico, anomalie evidenziabili radiograficamente o emerse da esami di laboratorio (ipercalcemia ecc..). Tutte le lesioni che coinvolgono i linfonodi e che misurano più di 20 mm di diametro sono considerate lesioni target: queste devono essere selezionate in base a dimensioni (includere quelle di maggior diametro, da 1 fino ad un massimo di 5 linfonodi colpiti) e adeguatezza nel ripetere misure accurate (mediante diagnostica per immagini o valutazione clinica). La somma del diametro maggiore di tutte le lesioni target deve essere registrata poiché servirà per valutare la risposta al trattamento mentre per le lesioni non target non è necessaria la misurazione ma solo la segnalazione di presenza/assenza osservata durante il monitoraggio.

La risposta terapeutica è in funzione del comportamento delle lesioni target, non target o della comparsa di nuove lesioni (maggiori di 15 mm di diametro).

La risposta al trattamento si classifica come:

- **risposta completa (CR)**: scomparsa di tutte le lesioni target e non target, i linfonodi sono tornati di dimensioni normali e non sono presenti nuove lesioni; milza e fegato sono nella norma.
- **risposta parziale (PR)**: si ha almeno una diminuzione del 30% della somma dei diametri maggiori delle lesioni target rispetto al valore iniziale
- **malattia progressiva (PD)**: si ha almeno un incremento del 20% della somma dei diametri maggiori delle lesioni target rispetto al minimo valore osservato al momento della diagnosi o durante il follow up. Il diametro di almeno una delle lesioni target è aumentato di 5 mm rispetto al suo diametro minore e si ha la comparsa di una o più nuove lesioni.
- **malattia stabile (SD)**: quadro in cui non si evidenzia una diminuzione dei diametri tale da classificare la malattia come PR o un incremento sufficiente da classificarla come PD, in assenza di nuove lesioni.

I parametri temporali sono criteri prognostici molto importanti per valutare l'efficacia di un trattamento chemioterapico. Il più importante e ripreso in letteratura è l'intervallo libero da malattia (Progression-Free Survival, PFS),

inteso come tempo trascorso dall'inizio del trattamento senza evidenza di una crescita progressiva del tumore; degni di nota sono anche il

tempo di sopravvivenza globale e il DFI (Disease-Free Interval, la quantità di tempo che trascorre senza recidiva di malattia)<sup>146,147</sup>.

In linea con l'oncologia umana, anche in medicina veterinaria si stanno facendo progressi nella valutazione della malattia minima residua (Minimal Residual Disease, MRD), volta a differenziare i casi reali di remissione completa da quelli apparenti (soggetti in remissione clinica completa ma con malattia residua a livello cellulare). Questa indagine prevede l'utilizzo di tecniche di imaging avanzate, di markers sierici (timidinchinasi, LDH o proteina C reattiva)<sup>2,73,99</sup> o molecolari (PCR)<sup>147</sup>. Secondo un lavoro recente dell'università di Tokio su 36 soggetti affetti da linfoma B ad alto grado di malignità, MRD ha un notevole significato prognostico durante le fasi iniziali della chemioterapia; lo studio valutava alla sesta e alla undicesima settimana i 36 cani trattati con un protocollo Madison-Wisconsin (25 settimane) al fine di amplificare, tramite PCR, una particolare sequenza genica per distinguere i soggetti MDR positivi dai soggetti MDR negativi. Il PFS era più lungo nei cani MDR negativi (337 giorni) rispetto ai cani MDR positivi (196 giorni)<sup>123</sup>.

## ***2.2 I FARMACI CHEMIOTERAPICI***

I chemioterapici citotossici danneggiano le cellule neoplastiche, interferendo con la sintesi di precursori di DNA oppure interagendo con il DNA stesso, impedendone la duplicazione. Altri bersagli sono la membrana cellulare, microtubuli, ormoni e fattori di crescita. Gli antineoplastici purtroppo non mostrano una tossicità selettiva nei confronti della neoplasia bensì delle cellule in rapida divisione (midollo osseo, epitelio intestinale, cute, ecc.): ciò spiega la tossicità associata a questi farmaci<sup>76</sup>.

I chemioterapici sono classificati didatticamente in tre gruppi, secondo meccanismo d'azione e fase del ciclo cellulare durante la quale agiscono:

- Agenti fase-specifici: distruggono le cellule che si dividono in fasi particolari del ciclo cellulare (antimetaboliti attivi durante la fase S o gli agenti antimitotici e alcaloidi vegetali attivi invece durante la fase M).
- Agenti fase-aspecifici: distruggono le cellule che si dividono indipendentemente dal ciclo cellulare (un esempio sono gli agenti alchilanti, la doxorubicina e il mitoxantrone).
- Agenti ciclo-aspecifici: tossici sia per cellule che si dividono sia per cellule in fase G0 (mostarde azotate o nitrosouree)<sup>78</sup>.

### **2.2.1 AGENTI ALCHILANTI**

Gli agenti alchilanti sono composti fase-aspecifici ed esercitano la loro attività citotossica su tutte le fasi del ciclo cellulare, anche se le cellule in fase S sono le più sensibili (dal momento che il loro DNA è parzialmente svolto e quindi più accessibile). Questi farmaci possiedono gruppi reattivi alchilici in grado di formare legami covalenti con il DNA quindi determinare rottura di catena e distruzione del template di DNA con conseguente interruzione delle informazioni necessarie per la divisione cellulare. Gli agenti alchilanti uccidono una percentuale fissa di cellule a una determinata dose, producendo una curva di risposta di tipo lineare: a maggiore dose di farmaco somministrata, corrisponde una maggiore frazione di cellule uccise. La citotossicità di questi principi attivi riflette l'equilibrio tra formazione di legami covalenti e loro rimozione grazie a processi cellulari di riparazione. Pertanto, l'aumentata escissione di nucleotidi alchilanti da

catene di DNA rappresenta il meccanismo con cui le cellule neoplastiche diventano resistenti agli agenti alchilanti. I principali bersagli della reazione di alchilazione sono posizioni O<sup>6</sup> e N<sup>7</sup> di guanina; il 6-alchilguanintransferasi (6-GT) è un enzima capace di rimuovere l'alchilazione in posizione O<sup>6</sup> di guanina: cellule a elevato contenuto di 6-GT tendono a diventare resistenti a questo gruppo di chemioterapici per l'aumentata capacità di sostituire il segmento danneggiato con nuovi nucleotidi. Un altro meccanismo di resistenza comune a questi farmaci è l'aumentata detossificazione intracellulare ad opera del glutathione-S-transferasi, enzima che coniuga glutathioni a diversi xenobiotici riducendone la citotossicità. Il gene oncosoppressore p53 è il maggiore responsabile nel riconoscimento del DNA alchilato e rotture di filamento: una volta riconosciuto il DNA danneggiato p53 determina arresto del ciclo cellulare ed apoptosi. Le cellule con p53 mutato sono resistenti agli agenti alchilanti ma questi principi attivi non sono substrato di Pg-170 (meccanismo di farmacoresistenza multipla). A questa categoria appartengono le mostarde azotate, le nitrosouree, alchil-sulfonati, aziridine, idrazine e tiazinici<sup>72</sup>.

**Tabella 2.2.1.-1 Agenti alchilanti (ripreso da 72 e modificato)**

<b>Mostarde azotate</b>	<b>Aziridine</b>	<b>Alchilsulfonati</b>	<b>Idrazine e derivati tiazinici</b>	<b>Nitrosouree</b>
Mecloretamina Ciclofosfamida Ifosfosfamida Clorambucile Melfalan	TioTEPA	Busulfan	Dacarbazina	Carmustina Lomustina

### 2.2.2 AGENTI ANTIMETABOLITI

Gli antimetaboliti sono analoghi strutturali di composti naturali richiesti per sopravvivenza e divisione cellulare, tra cui basi puriniche e pirimidiniche, nei confronti dei quali agiscono da antagonisti. Sono agenti fase-specifici (fase S) quindi efficaci nei confronti di tumori con elevata frazione di accrescimento (per esempio linfomi e leucemie); questi farmaci inibiscono direttamente gli enzimi necessari per la sintesi o la riparazione del DNA oppure possono sostituirsi alle basi puriniche o pirimidiniche. Gli antimetaboliti sono per lo più pro farmaci e richiedono conversione in composti attivi attraverso una serie di reazioni enzimatiche. Ogni enzima coinvolto in questo processo rappresenta un sito potenziale di sviluppo di resistenza<sup>78</sup>. A questa categoria di farmaci appartengono: antagonisti pirimidinici (citosina arabinoside, gemcitabina, 5-fluorouracile), antagonisti purinici (6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, cladribina, azatioprina), antagonisti di folati (metotrexate) e antagonisti di ribonucleotidoreduttasi (idrossiurea). I principali meccanismi di resistenza sono: ridotta assunzione da parte delle cellule neoplastiche, aumentata inattivazione o alterata affinità enzima-agente antimetabolita<sup>72</sup>.

*Tabella 2.2.2.-1 Agenti antimetaboliti (ripreso da 72 e modificato)*

<b>Antagonisti pirimidinici</b>	<b>Antagonisti di folati</b>	<b>Antagonisti purinici</b>	<b>Antagonisti di ribonucleotidoreduttasi</b>
Citosina arabinoside Gemcitabina 5-fluorouracile	Metotrexate	6mercaptopurina 6-tioguanina Fludarabina Cladribina Azatioprina	idrossiurea

### 2.2.3 ANTIBIOTICI ANTITUMORALI

Sono farmaci chemioterapici fase-aspecifici, ad eccezione di bleomicina (fasi G2 e M). Di questa categoria fanno parte antracicline, bleomicina, D-actinomicina, mitomicina C e plicamicina. Sono prodotti di fermentazione di ceppi di *Streptomyces* e hanno diversi meccanismi d'azione:

- legame con DNA per alchilazione o intercalazione
- interazione con topoisomerasi II e successiva rottura di catene di DNA
- formazione di radicali liberi che danneggiano la membrana cellulare
- interazione con trasduzione del segnale, tra superficie cellulare e nucleo.

La resistenza è mediata da P-gp 170 tranne che per la bleomicina (aumentata inattivazione, ridotto accumulo e aumentata riparazione del danno al DNA)<sup>78</sup>.

Le antracicline, i composti maggiormente utilizzati nella pratica clinica e nel trattamento dei linfomi (in particolare la Doxorubicina) agiscono intercalandosi tra due basi adiacenti nella doppia elica di DNA, legandosi alla struttura planare tetraciclica della catena mediante legami a idrogeno e alterandone la conformazione tridimensionale. Questo meccanismo impedisce al DNA stesso di fungere da stampo per DNA polimerasi e RNA polimerasi, inibendo la sintesi degli acidi nucleici. L'inibizione di questi enzimi è poco importante dal punto di vista clinico perché si verifica a dosi di antracicline troppo tossiche per poter essere utilizzate sui pazienti. Alle concentrazioni di farmaco comunemente utilizzate le antracicline inibiscono le topoisomerasi II, formando un complesso farmaco-DNA-topoisomerasi che comporta

rottura di catena e blocco di mitosi. Topoisomerasi II è un enzima associato a matrice nucleare, che gioca un ruolo critico nel risolvere i superavvolgimenti torsionali in cui si trova il DNA. Le antracicline dunque sono in grado di alterare la conformazione tridimensionale degli acidi nucleici (intercalandosi tra le sue catene ed arrestando l'azione di topoisomerasi II nel punto di clivaggio) ma sono anche in grado di inibire topoisomerasi II bloccandone l'attività catalitica, senza legarsi a DNA (meccanismo non intercalante). Durante il loro meccanismo d'azione questi composti vanno incontro a reazioni chimiche di riduzione (in presenza di sufficienti molecole di ossigeno) generando composti reattivi ad attività ossidante (superossidi) in grado di danneggiare le membrane lipidiche cellulari. Le cellule dell'organismo hanno sviluppato vari sistemi per difendersi dal danno ossidativo: numerosi enzimi infatti sono in grado di ridurre i perossidi a composti meno reattivi (superossidodismutasi, catalasi e glutationeperossidasi). L'attività di tali enzimi è meno pronunciata nel muscolo cardiaco e c'è dunque una maggiore tossicità a questo livello. La doxorubicina è tra gli agenti citotossici maggiormente utilizzati in oncologia umana e veterinaria, nel trattamento di neoplasie emopoietiche, carcinomi e sarcomi. Questo composto è in grado di liberare il ferro da ferritina, chelandolo; i complessi ferro-antracicline così formati si legano a DNA mediante meccanismi non intercalanti, ossidando sia membrane cellulari sia gruppi sulfidrilici critici. Il Dexrazoxane è un agente in grado di chelare il ferro e in teoria di prevenire la cardiotoxicità ma non sempre si è dimostrato utile a questo scopo<sup>7,72</sup>

**Tabella 2.2.3.-1 Antibiotici antitumorali (ripreso da 72 e modificato)**

<b>Antibiotici antitumorali</b>	<b>Antracicline</b>
Bleomicina Actinomicina D Mitomicina C	Doxorubicina Mitoxantrone Epirubicina Idarubicina

#### **2.2.4 ALCALOIDI DELLE PIANTE**

Questi composti, alcaloidi della Vinca rosea, diversamente dalla maggior parte dei chemioterapici non bersagliano il DNA ma si legano alla tubulina impedendo l'assemblaggio quindi la formazione del fuso mitotico: agendo in fase M e arrestando le cellule in metafase (con conseguente apoptosi) sono considerati farmaci fase-specifici. Oltre all'inibizione della mitosi, gli alcaloidi della vinca distruggono l'integrità funzionale delle piastrine, molto ricche di tubulina e dipendenti dai microtubuli per il mantenimento della loro struttura. La resistenza compare velocemente e dipende da meccanismi di alterazione del bersaglio (molecole di tubulina) e P-gp 170 mediati. I chemioterapici più comuni sono la Vincristina e la Vinblastina.

#### **2.2.5 ORMONI E ALTRI COMPOSTI**

Gli ormoni steroidei trovano impiego nella terapia del linfoma canino. Il prednisone è quello maggiormente usato ed è presente nei protocolli chemioterapici per la sua capacità di indurre apoptosi delle cellule neoplastiche anche se le cellule tumorali sviluppano precocemente resistenza a questa categoria di farmaci (inducono espressione di P-gp 170). I comuni effetti collaterali includono poliuria, polidipsia, polifagia, respiro affannoso, debolezza, alterazioni dermatologiche,

predisposizione alle infezioni, atrofia muscolare, resistenza insulinica, epatopatia da steroidi ed iperglicemia<sup>76,87,124</sup>.

L-asparaginasi è un composto utilizzato in medicina veterinaria per il trattamento di linfomi e leucemie acute, un agente fase-specifico (agisce su fase G1 del ciclo cellulare). La crescita cellulare richiede la disponibilità di nutrienti specifici e cofattori necessari per la sintesi proteica. L-asparagina è un amminoacido non essenziale, sintetizzato a partire da acido aspartico mediante intervento di L-asparaginsintetasi, un enzima costitutivo di molti tessuti; alcune cellule leucemiche (soprattutto ad immunofenotipo T) sono prive di tale enzima e dipendono da fonti extracellulari di L-asparagina per sintetizzare proteine. Questo enzima idrolizza L-asparagina in acido aspartico ed ammoniaca, determinando un deficit cellulare di L-asparagina. Le cellule normali e quelle neoplastiche resistenti hanno elevati livelli di L-asparaginasintetasi, per sintetizzare ex novo L-asparagina endogena a partire da glutammina a livello epatico e non sono dunque colpite da L-asparaginasi. Al contrario, le cellule neoplastiche sensibili non posseggono L-asparaginasintetasi e necessitano di fonti esogene dell'amminoacido: la mancata presenza di quest'ultimo si traduce in una inibizione della sintesi proteica e ritardata inibizione di sintesi di RNA e DNA, che scatena apoptosi. Il meccanismo principale di resistenza a questo farmaco dunque è la capacità acquisita delle cellule tumorali di sintetizzare L-asparagina<sup>72,133</sup>.

### **2.3 TOSSICITA' ASSOCIATA A CHEMIOTERAPIA**

L'oncologo medico si può trovare a dover gestire gli effetti collaterali derivanti dalla chemioterapia: come già accennato i farmaci chemioterapici non sono selettivi per le cellule neoplastiche ma

bersagliano anche cellule dell'organismo caratterizzate da intensa attività proliferativa (midollo osseo, tratto gastroenterico e cute): se da un lato l'impiego di dosi elevate di chemioterapico determina la morte di un maggior numero di cellule tumorali, dall'altro si può accompagnare a manifestazioni tossiche. Lo scopo di qualunque terapia antineoplastica deve essere il miglioramento della qualità di vita dell'animale, non necessariamente il prolungamento della sopravvivenza quindi è compito del veterinario informare il proprietario circa gli obiettivi della terapia, i costi e gli eventuali effetti collaterali; se il trattamento si accompagna a scarsa qualità di vita dell'animale, molto spesso il proprietario non è motivato a continuare la terapia per motivi emotivi ed economici (costi aggiuntivi di terapie di supporto)<sup>77</sup>.

La tossicità associata a chemioterapia può essere classificata come acuta (al momento del trattamento o al massimo 24-48 h dopo), acuta ma ritardata (da 2 a 14 giorni dopo il trattamento) o cronica (effetti tossici cumulativi dopo settimane, mesi o anni dal trattamento). La tossicità immediata può includere reazioni allergiche (per esempio in seguito a somministrazione di L-asparaginasi) o episodi di nausea e vomito (con agenti specifici come cisplatino o in seguito a somministrazione troppo rapida di doxorubicina). La tossicità acuta ritardata si può manifestare con soppressione midollare, nausea, vomito e diarrea ma spesso questi effetti collaterali non sono gravi e non precludono una buona qualità di vita per l'animale nel periodo post chemioterapia. Esempi di tossicità cronica o cumulativa sono la cardiomiopatia indotta da doxorubicina o le problematiche renali causate da cisplatino<sup>51</sup>.

Sappiamo, come già accennato, che le P-glicoproteine sono codificate dal gene ABCB1 (MDR1) e sono presenti fisiologicamente in molti tessuti svolgendo un ruolo basilare nella farmacocinetica di molti farmaci. Quelle razze (soprattutto Border Collie) che presentano la mutazione ABCB1-1 $\Delta$  hanno maggiore probabilità di presentare un'alterata escrezione biliare o renale della vincristina e manifestano gravi effetti collaterali conseguenti alla sua somministrazione. Per verificare questa ipotesi sono stati fatti alcuni studi; K. L. Mealey sostiene che questa mutazione riguardi la maggior parte di Collie e in un lavoro del 2008 su 34 cani, 8 erano omozigoti o eterozigoti per la mutazione ABCB1-1. A questi soggetti veniva somministrata Vincristina (dosaggio 0.5-0.7 mg/M<sup>2</sup>) e 6 di loro mostravano una marcata tossicità ematologica (neutropenia e trombocitopenia). Lo studio dimostra che i soggetti con questa mutazione hanno una maggiore probabilità (75%) di sviluppare effetti collaterali rispetto al gruppo dei sani (26 cani). L'autrice inoltre sottolinea che gli stessi soggetti non sviluppano mielotossicità o tossicità gastroenterica in seguito a somministrazione di ciclofosfamide, un agente alchilante che come i farmaci di questa categoria non è substrato di P-gp<sup>88</sup>. Considerazioni simili emergono da un lavoro recente di Lind e collaboratori, i quali riportano una correlazione statistica (P = 0.024) fra sviluppo di VAM (vincristine-associated myelosuppression) e razza: 3 Border Collie su 5 presentavano mielotossicità, una proporzione significativamente più elevata rispetto agli altri cani (0 su 21 in questo studio)<sup>65</sup>.

### **2.3.1 TOSSICITA' EMATOLOGICA**

La mielosoppressione è un effetto collaterale abbastanza comune e i precursori proliferanti linfoidi e mieloidi sono molto sensibili agli effetti dei chemioterapici tradizionali. La distruzione dei progenitori ciclianti presenti nel midollo osseo determina citopenie periferiche: i neutrofili hanno emivita di 4-8 ore, le piastrine 7-9 giorni, i globuli rossi di 120 giorni nel cane e 70 nel gatto quindi è evidente che neutrofili e piastrine devono essere continuamente rinnovati e una alterata funzionalità midollare si traduce in neutropenia, piastrinopenia e anemia. Per la maggior parte dei farmaci citotossici il nadir neutropenico (il punto più basso dei valori nel tempo) avviene 5-10 giorni dalla somministrazione, mentre quello piastrinopenico dopo 1-2 settimane. L'anemia invece è più tardiva e contribuisce al quadro clinico (affaticamento, tachipnea) per la riduzione degli eritrociti deputati al trasporto di ossigeno ai tessuti. E' molto importante intervallare la somministrazione di farmaci mielosoppressivi per non danneggiare le cellule staminali in mitosi dopo il primo ciclo<sup>77</sup>. I chemioterapici tradizionalmente associati a mielosoppressione (neutropenia e trombocitopenia sono i reperti clinici maggiormente evidenziati) sono doxorubicina, agenti alchilanti e alcaloidi della vinca<sup>15,100,109,119,139</sup>. I neutrofili sono le cellule deputate a combattere i batteri presenti in circolo e nei tessuti. La neutropenia chemioterapia-indotta rappresenta una delle complicazioni più gravi della terapia poiché pone il paziente a rischio di infezioni: esso è maggiormente predisposto a questa eventualità per la presenza del tumore stesso che altera la resistenza immunitaria dell'organismo. Questo sintomo è variabile da forme clinicamente silenti a forme rapidamente fatali se a

esso si somma tossicità gastroenterica (e ulcerazioni mucosali) con passaggio in circolo dei batteri aerobi Gram + o Gram - <sup>72</sup>.

Per scongiurare questa eventualità molti veterinari prescrivono antibiotici a scopo profilattico dal momento che l'insorgenza di effetti collaterali riduce la qualità della vita del paziente, aumenta i costi e spesso esista in una rinuncia al trattamento da parte del proprietario. In un lavoro recente di Regan (2012) in cui vengono intervistati 519 veterinari è emerso che molti somministrano, in presenza di neutropenia, profilassi antibiotica con amoxicillina-acido clavulanico (26%), enrofloxacin (15%), trimetoprim-sulfadiazina (15%) cefalessina (10%) e altri (2%) mentre il 32% ha risposto che la somministrazione dipendeva dalla situazione del paziente<sup>119</sup>. Un lavoro del 2007 su 73 cani con linfoma e osteosarcoma inoltre dimostra che la somministrazione a scopo profilattico di trimetoprim-sulfadiazina in pazienti sottoposti a chemioterapia non dà antibiotico-resistenza e riduce frequenza e tossicità ematologica e gastroenterica<sup>21</sup>.

Il monitoraggio ematico degli animali a cui si pratica chemioterapia rappresenta il metodo più efficace per prevenire gravi infezioni o emorragie potenzialmente letali quindi è fondamentale controllare l'esame emocromocitometrico 5-10 giorni dopo la somministrazione di un farmaco mielosoppressivo.

I pazienti neutropenici possono manifestare stato di malessere generale, accompagnato da depressione e scarsa risposta agli stimoli esterni; vengono divisi dal punto di vista clinico in febbrili e afebbrili. Il paziente afebbrile e asintomatico con neutropenia lieve ( $>1000 \mu\text{l}$ ) in genere non richiede alcun trattamento mentre in caso di neutropenia marcata può essere gestito a casa dal proprietario con

somministrazione degli antibiotici precedentemente elencati. I proprietari inoltre devono misurare la temperatura rettale 2 volte al giorno e in caso di rialzo febbrile contattare il veterinario<sup>29,77,137</sup>.

La febbre costituisce un'emergenza medica in un animale neutropenico e questi pazienti vanno trattati in modo aggressivo in quanto possono essere già in preda ad un processo infiammatorio di tipo settico. E' fondamentale ospedalizzare il paziente per terapia immediata e monitoraggio continuo. La somministrazione dei chemioterapici viene interrotta (tranne i corticosteroidi che devono essere scalati gradualmente onde evitare la comparsa di ipoadrenocorticismi iatrogeno). La fluidoterapia endovenosa con soluzioni cristalloidi è molto importante per ripristinare il deficit di fluidi e bisogna somministrare antibiotici ad ampio spettro per combattere i batteri responsabili di sepsi; questi ultimi generalmente appartengono alla flora endogena gastroenterica che penetra nel circolo ematico in seguito al deterioramento delle cellule intestinali dovuto alla tossicità gastroenterica dei farmaci. Gli antibiotici devono essere somministrati a pieno dosaggio e per un periodo sufficientemente lungo di tempo: la combinazione migliore è quella tra ampicillina e amikacina o tra cefazolina ed enrofloxacin. E' indicato eseguire una ricerca del focolaio settico mediante sangue, urine, radiografie toraciche, ecografia addominale, valutazione del midollo osseo, antibiogramma ed esami colturali. Non appena il valore dei neutrofilii rientra nel range di normalità e lo stato clinico del paziente si è stabilizzato è possibile dimetterlo con una terapia da somministrare a domicilio a base di trimetoprim e sulfadiazina per circa 5-7 giorni (7.5 mg/kg per os ogni 12 ore) o enrofloxacin (5 mg/kg per os ogni 24 ore). Successivamente, è possibile somministrare di nuovo il chemioterapico a dose ridotta del

25 % per poi aumentare gradualmente il dosaggio<sup>77</sup>. La mortalità in seguito a questa complicazione, in un lavoro recente su 70 cani ricoverati presso l'ospedale dell'università della Pennsylvania, risultava essere 8.5 %<sup>15</sup>. L'ingegneria biomolecolare ha messo a disposizione una nuova classe di farmaci, i fattori di stimolazione midollare o CSF (Colony Stimulating Factor), che possono essere utilizzati nei casi gravi di neutropenia; si tratta di citochine ricombinanti umane che promuovono la differenziazione di cellule staminali pluripotenti e favoriscono la proliferazione di cellule che si sono differenziate, stimolandone le funzioni specifiche (come per esempio chemiotassi e fagocitosi). Lo scopo è quello di ridurre i tempi di ospedalizzazione e durata della terapia antibiotica, favorire un rapido recupero ed evitare pericolose infezioni batteriche secondarie; questi composti, inoltre, ci permettono di non ridurre il dosaggio di chemioterapico o di non posticiparne la somministrazione. Il trattamento con CSF deve essere iniziato 24 ore dopo l'ultima dose di chemioterapico. Esistono due gruppi di CSF: fattori stimolanti le colonie granulocitiche (G-CSF) e fattori stimolanti le colonie granulocitiche e macrofagiche (GM-CSF); i primi sono usati più spesso perché si associano a minori complicazioni e rappresentano mediatori importanti di risposte che richiedono aumento di neutrofili e di difesa dell'organismo. Dal momento che non esiste G-CSF ricombinante canino o felino, in medicina veterinaria si usa quello umano (rG-CSF); quest'ultimo, se somministrato per qualche giorno, aumenta la produzione neutrofilica quindi accelera il rilascio di tali cellule nel circolo periferico<sup>77</sup>. Questi composti (di cui fanno parte filgrastim, lenograstim e pegfilgrastim), possono dunque essere usati per i pazienti neutropenici febbrili ma alcuni veterinari li utilizzano solo nei

casi di grave neutropenia ( $\leq 100$  fino a  $500/\mu\text{L}$ ) o che persiste per più di 72 ore<sup>137</sup>.

La piastrinopenia è una complicanza meno frequente in pazienti sottoposti a chemioterapia ed è causata da diminuita sintesi piastrinica o aumentata distruzione periferica. Il nadir si verifica intorno al decimo o dodicesimo giorno post chemioterapia e spesso è di lieve entità (non richiede interventi specifici). Nei pazienti oncologici, analogamente alla neutropenia, la piastrinopenia può dipendere dal trattamento antineoplastico ma anche dall'infiltrazione del midollo osseo. I sanguinamenti spontanei sono rari se la conta piastrinica è  $> 20000 \mu\text{l}$ ; in questo caso, si possono notare petecchie diffuse, emorragie gengivali, emottisi, ematuria, melena, versamenti ed emorragie gastroenteriche<sup>72</sup>.

Il VCOG ha proposto recentemente delle linee guida per classificare la tossicità midollare (tabella 2.3.1-1) in base alla conta piastrinica e neutrofilia, all'ematocrito e all'emoglobina; per grado 0 si intende assenza del sintomo mentre il grado 5 indica la morte del soggetto<sup>154</sup>.

**Tabella 2.3.1-1 Classificazione della tossicità ematologica nel cane secondo VCOG (ripreso da 154 e modificato)**

<b>Grado</b>	<b>Descrizione</b>
<b>1</b>	Hb 10 g/dl fino a LBN PCV 30% fino a LBN PLT 100.000-150.000/ $\mu$ l N 1.500/ $\mu$ l fino a LBN
<b>2</b>	Hb 8-10 g/dl PCV 25-29,9% PLT 50.000-99.000/ $\mu$ l N 1.000-1.499/ $\mu$ l
<b>3</b>	Hb 6,5-8 g/dl PCV 20-24,9% PLT 25.000-49.000/ $\mu$ l N 500-999/ $\mu$ l
<b>4</b>	Hb <6,5g/d PCV <20% PLT <25.000/ $\mu$ l N <500/ $\mu$ l

**Hg=emoglobina; LBN=limite basso del Normale N=neutrofili; PCV=ematocrito;  
PLT=piastrine**

**Tabella 2.3.1-2 Trattamento della neutropenia (ripreso da 75 e modificato)**

	<b>Pazienti febbrili (&lt;1500 N/<math>\mu</math>l)</b>	<b>Pazienti afebrili (&gt;1500 N/<math>\mu</math>l)</b>
<b>Ricovero</b>	richiesto	Non necessario
<b>Fluidoterapia</b>	con liquidi freddi; 40-60 ml/kg ev per la prima ora, poi 10-12 ml/kg/h	non necessaria
<b>Antipiretici</b>	flunixin meglumina 0,25 mg/kg ev	Non necessari
<b>Antibiotici</b>	Per via parenterale: gentamicina (2,2-4,4 mg/kg tid ev lenta in 30 minuti per 4-5 giorni e ampicillina (10-20 mg/kg tid ev) cefazolina (20 mg/kg tid ev) ed enrofloxacin (5 mg/kg bid ev acido clavulanico e amoxicillina 22 mg/kg bid/tid im/sc ed enrofloxacin 5mg/kg bid ev lenta ceftriazone (20 mg/kg bid ev/im)	Possibile, da somministrare a casa dal proprietario per via orale: associazione trimetoprim-sulfadiazina 15-30 mg/kg sid/bid enrofloxacin 5 mg/kg bid
<b>G-CSF</b>	filgrastim 10 $\mu$ g/kg/die sc per 2-4 giorni consecutivi lenograstim 10 $\mu$ g/kg/die sc pegfilgrastim 6 mg sc all'inizio della chemioterapia	Non necessari

### **2.3.2 TOSSICITA' GASTROENTERICA**

La tossicità gastroenterica rappresenta una complicanza abbastanza comune della terapia antitumorale e la sua gravità dipende da tipo di chemioterapico, dosaggio, durata del trattamento e suscettibilità individuale; solitamente questo effetto collaterale si risolve in pochi giorni ed ha prognosi favorevole. La chemioterapia contribuisce alla malnutrizione attraverso molteplici meccanismi quali anoressia, nausea e vomito e non è sempre facile stabilire se l'anoressia sia conseguenza del trattamento oppure della progressione del tumore. Talvolta cambiare le abitudini alimentari può rivelarsi utile per indurre l'animale a mangiare quindi sostituire la dieta abituale con una più appetibile. Nel paziente oncologico si ha un'attività metabolica notevolmente aumentata con persistente perdita azotata: è necessaria una dieta ben digeribile, energetica e ricca di proteine ad elevato valore biologico. In alternativa si può ricorrere a sostanze stimolanti l'appetito come ciproeptadina, prednisolone e diazepam<sup>77</sup>. Nausea e vomito sono effetti collaterali molto comuni e insorgono maggiormente in seguito a terapia con dacarbazina, cisplatino, doxorubicina, metotrexato, actinomicina D, ciclofosfamide e vincristina<sup>29,139</sup>. In letteratura ci sono due studi retrospettivi che hanno valutato gli effetti collaterali gastroenterici in seguito alla somministrazione di vincristina, ciclofosfamide e doxorubicina nel cane e in entrambi i lavori nausea, vomito, diarrea e disappetenza comparivano dal 20 al 50 % dei pazienti<sup>89,139</sup>.

La diarrea secondaria a chemioterapia è caratterizzata da infiammazione della parete intestinale e la flogosi stessa promuove il rilascio di prostaglandine, leucotrieni e citochine che contribuiscono

alla secrezione di fluidi ed elettroliti nel lume intestinale. Questo sintomo, soprattutto se di lunga durata, può provocare gravi conseguenze tra cui ipovolemia e squilibri elettrolitici. Il trattamento iniziale di diarrea non complicata (grado 1-2 della classificazione VCOG) prevede restrizione dietetica (cibi poveri in fibre e grassi) e somministrazione nel cane di metronidazolo (15 mg/kg bid po) mentre cani con diarrea di grado 3-4 devono essere ospedalizzati e sottoposti a fluidoterapia endovenosa con farmaci specifici.

Il vomito può comparire in modo acuto (entro 24-48 ore) oppure ritardato (da 1 a 5 giorni post-trattamento) mentre la nausea prodromica (o anticipatoria) può insorgere se non c'è stato un adeguato controllo di nausea e vomito al ciclo precedente (episodi di vomito scatenati da un riflesso condizionato alla vista della chemioterapia). Il meccanismo dell'emesi è regolato dal centro del vomito, situato nella zona reticolare del bulbo encefalico che riceve stimoli da organi viscerali come stomaco, intestino o zona chemiorecettore (situata sul pavimento del IV ventricolo cerebrale e sottoposta a stimoli chimici provenienti dal circolo ematico). La strategia migliore è quella di prevenire nausea e vomito. I farmaci più comunemente usati in medicina veterinaria sono gli antagonisti di dopamina (metoclopramide), serotonina (ondasetron e dolasetron) e di neurochinasi-1 (maropitant), cioè di neurotrasmettitori che stimolano il centro del vomito<sup>72</sup>. Il maropitant è un farmaco molto usato nella pratica clinica per prevenire questi effetti collaterali, nonché oggetto di alcuni importanti studi<sup>82,115</sup>; è un antagonista potente e selettivo del recettore neurochinina (NK-1) ed agisce inibendo nel SNC il legame della sostanza P (un neurotrasmettitore peptidico che si lega a questi recettori e sembra essere responsabile di emesi

ritardata). In uno studio di Rau (randomizzato, doppio cieco e su placebo) veniva valutata l'efficacia di questo farmaco nel prevenire il vomito associato a doxorubicina nel cane: ad un gruppo è stato somministrato il maropitant e ad un secondo gruppo il placebo per poi valutare la gravità degli effetti collaterali (secondo la classificazione VCOG). Lo studio comprendeva un totale di 59 cani ma solo 49 di essi lo avevano completato; 24 erano nel gruppo A e ricevevano il maropitant dopo la prima somministrazione di doxorubicina e il placebo dopo la seconda mentre al gruppo B (di 25 cani) è stato dato il farmaco dopo la seconda somministrazione e il placebo dopo la prima. Non c'erano differenze tra le popolazioni di cani per quanto riguardava l'età, il peso, il sesso e la razza. Sia l'incidenza che la gravità del vomito, nel gruppo dei cani trattati con il maropitant, erano significativamente diminuite ( $P < 0.001$ ); un risultato inatteso era la diminuzione della frequenza e della gravità della diarrea ( $P < 0.24$ ) nei cani trattati con maropitant. Gli autori ipotizzano che la sostanza P possa giocare un ruolo importante anche nella patogenesi di questo effetto collaterale: essa infatti stimola il rilascio di citochine e neuropeptidi che modulano l'infiammazione, la diarrea e la motilità intestinale e bloccando i recettori NK1 a livello del tratto gastroenterico, il maropitant potrebbe ridurre l'incidenza e la gravità della diarrea post chemioterapia<sup>115</sup>. Risultati discordanti emergono da un lavoro molto recente di Mason (uno studio randomizzato) che valuta l'effetto del medesimo farmaco in seguito a somministrazione di vincristina e ciclofosfamide: non ci sono differenze significative tra i cani trattati e quelli non trattati con maropitant e sulla base di questo studio gli autori suggeriscono di somministrare il farmaco al momento della comparsa degli effetti collaterali e non preventivamente<sup>82</sup>.

Un lavoro di Withers e collaboratori ha studiato l'effetto del digiuno sul vomito associato a somministrazione di doxorubicina; alcuni studi di medicina umana hanno dimostrato che il digiuno riduce la proliferazione delle cellule intestinali attraverso il blocco di esse in fase G1 dove sono meno sensibili alla tossicità dei chemioterapici. In questo lavoro su 15 cani, solo 5 vomitano e 4/5 non vomitano se tenuti a digiuno ( $P=0.50$ ). La significatività statistica non è molto elevata ma l'ipotesi è suggestiva quindi degna di studi futuri<sup>158</sup>.

La gravità dei sintomi gastroenterici è classificata secondo i criteri VCOG (grado 0 = assenza dei sintomi, grado 5= morte del soggetto)<sup>154</sup>

**Tabella 2.3.2-1 Classificazione della tossicità ematologica nel cane secondo i criteri VCOG (ripreso da 154 e modificato)**

Grado	Descrizione
1	<p><b>Vomito:</b> &lt;3 episodi in 24 h senza profilassi</p> <p><b>Diarrea:</b> aumento defecazione senza profilassi (2 volte rispetto al normale)</p> <p><b>Anoressia:</b> cambio di dieta necessario per mantenere l'appetito</p>
2	<p><b>Vomito:</b> 3-5 episodi in 24 h senza profilassi</p> <p><b>Diarrea:</b> aumento defecazione &gt; 2-6 volte al giorno con profilassi</p> <p><b>Anoressia:</b> ridotta assunzione di cibo in assenza di dimagrimento significativo</p>
3	<p><b>Vomito:</b> &gt; 5 episodi in 24 h</p> <p><b>Diarrea:</b> aumento defecazione &gt; 6 volte rispetto al normale</p> <p><b>Anoressia:</b> durata 3-5 giorni con dimagrimento</p>
4	<p><b>Vomito:</b> collasso emodinamico</p> <p><b>Diarrea:</b> collasso emodinamico</p> <p><b>Anoressia:</b> durata &gt; 5 giorni</p>

### 2.3.3 TOSSICITA' CARDIACA

La cardiotossicità è una complicazione della terapia con doxorubicina e nel cane si possono verificare due tipi di tossicità cardiaca: acuta (si manifesta subito dopo la somministrazione) e cronica. La prima è reversibile e caratterizzata da aritmie prive di significato clinico (se non esistono malattie cardiache sottostanti). Si ritiene che questo meccanismo sia dovuto a un rilascio di catecolamine indotto dalla stessa doxorubicina e mediato dall'istamina. La tossicità cardiaca è dose-dipendente, cumulativa (240 mg/m<sup>2</sup> nel cane) e irreversibile; è caratterizzata da cardiomiopatia dilatativa e conseguente insufficienza cardiaca congestizia. La causa esatta all'origine di questo fenomeno è sconosciuta ma s'ipotizza un ruolo dei radicali liberi responsabili di stress ossidativo a carico del miocardio; le alterazioni subcellulari comprendono perdita di miofibrille, vacuolizzazione di cellule miocardiche, degranolazione mastocitica (indotta da doxorubicina) e secondaria liberazione d'istamina che acuisce il danno miocardico<sup>29,159</sup>. Nonostante alcune razze siano maggiormente a rischio (Alano, Dobermann), la cardiomiopatia dilatativa può insorgere in assenza di fattori di rischio e perciò è consigliabile uno screening cardiologico in tutti i cani, sia prima che durante il trattamento con doxorubicina. E' opportuno dunque che i pazienti siano sottoposti a esame ecocardiografico per valutare la contrattilità miocardica (l'impiego del farmaco va interrotto se si evidenzia una diminuzione della frazione di accorciamento <28%) e alla valutazione sierica della troponina, marker sensibile di danno cardiaco. La diagnosi di cardiomiopatia si basa su esame fisico, ECG ed ecocardiografia. Una volta instauratasi, la prognosi è infausta e il tasso di mortalità elevato. Le alterazioni di ECG

includono aritmie, appiattimento dell'onda T, prolungamento dell'intervallo QT e riduzione di voltaggio di onda R<sup>77</sup>. Uno studio clinico di Mauldin e collaboratori analizzava le anomalie cardiache scoperte in 32 dei 175 cani a cui era stata somministrata doxorubicina; 31 soggetti mostravano anomalie nel tracciato elettrocardiografico (in media dopo 77 giorni dall'inizio del trattamento) mentre 7 cani avevano sviluppato una grave forma di insufficienza cardiaca congestizia con conseguente decesso<sup>83</sup>.

Le strategie messe a punto per prevenire la cardiomiopatia indotta da doxorubicina sono:

- utilizzo di analoghi come idarubicina o epirubicina; gli effetti di quest'ultimo farmaco sono stati studiati recentemente in un lavoro di Marrington e collaboratori ed è stato visto che su 139 cani 81 (58%) manifestavano effetti collaterali post terapia (con prevalenza di sintomi gastroenterici) ma nessuno di loro sviluppava cardiotossicità cronica<sup>81</sup>.
- Cambiare modalità di somministrazione: prolungare la durata di infusione del farmaco; in un lavoro del 2009, Gillings e collaboratori hanno testato l'ipotesi che un'infusione lunga un'ora di doxorubicina riducesse la cardiotossicità. Su 133 cani soltanto 16 (12%) hanno sviluppato anomalie elettrocardiografiche, statisticamente più basse rispetto allo studio di Mauldin (17.7%)<sup>47</sup>.
- Somministrare agenti cardioprotettori: il dexrazoxane è un agente chelante il ferro e dalla sua idrolisi si generano composti che chelano e rimuovono i radicali liberi e i complessi doxorubicina-ferro prevenendo la perossidazione lipidica; questo farmaco, inoltre, sequestra il ferro ed altera l'omeostasi

cellulare sideremica, proteggendo le cellule da cardiotossicità antracicline-indotta. In medicina umana questo farmaco è stato ampiamente studiato e deve essere somministrato per via endovenosa alla dose di 300 mg/m<sup>2</sup> (rapporto 1:10 con doxorubicina che può essere somministrata dopo 10 minuti). In letteratura è presente un solo studio retrospettivo su 25 cani che valuta gli effetti cardioprotettivi del dexrazoxane; nei pazienti trattati con doxorubicina e dexrazoxane c'è stata una riduzione del 50% della cardiotossicità (P <0,05)<sup>35</sup>.

#### **2.3.4 CISTITE EMORRAGICA STERILE**

Ciclofosfamide è un profarmaco utilizzato in molti protocolli chemioterapici e viene convertito da parte del sistema microsomiale epatico a 4-idrossiciclofosfamide e acroleina; quest'ultimo è un metabolita ritenuto responsabile di cistite emorragica sterile (SHC, Sterile Haemorrhagic Cystitis): i sintomi possono comparire in maniera acuta o, più spesso, da qualche giorno fino a mesi dopo la somministrazione di ciclofosfamide e sono riconducibili a ematuria, stranguria, pollachiuria e disuria<sup>32</sup>. Questo effetto collaterale è presente nel 10% circa dei soggetti e l'esame del sedimento urinario rivela la presenza di eritrociti e proteine con assenza di piuria: l'infiammazione è inizialmente sterile ma può diventare infetta in seguito a disfacimento mucosale e colonizzazione batterica<sup>32</sup>. Si pensa inoltre che il processo infiammatorio cronico causato da acroleina possa aumentare il rischio di carcinoma a cellule di transizione a carico della vescica del cane ma non ci sono molti lavori in letteratura che confermano questa ipotesi<sup>97</sup>. I fattori che contribuiscono all'insorgenza

di cistite emorragica sterile sono dose, sesso (soprattutto femminile), frequenza e via di somministrazione (endovenosa)<sup>20,42</sup>. In uno studio caso-controllo di Gaeta e collaboratori (su 22 cani affetti da SHC e 66 controlli) è stata individuata una significatività statistica fra l'intensità di dose (200 mg/m<sup>2</sup>) e la comparsa di cistite emorragica sterile (P<0.001)<sup>42</sup>. In merito a questo, un lavoro recente di Best valuta l'incidenza di SHC conseguente alla somministrazione della massima dose tollerata di ciclofosfamide ma ripartita in tre giorni. Per questo studio sono stati reclutati 57 cani e i risultati vengono comparati con 2 lavori<sup>20,43</sup> in cui il farmaco era stato somministrato in un solo giorno alla massima dose tollerata. Nessuno dei 57 pazienti ha sviluppato cistite quindi l'incidenza di questo effetto collaterale risulta essere significativamente più bassa (P<0.001) dei 2 lavori presenti in letteratura (24/219)<sup>11</sup>.

Spesso questo farmaco viene somministrato senza adottare misure mediche di profilassi ma si preferisce istruire il proprietario con semplici accorgimenti come quello di somministrare ciclofosfamide al mattino per permettere al cane di urinare frequentemente durante la giornata; con questo meccanismo si previene una concentrazione eccessiva e un contatto prolungato dell'acroleina con la mucosa vescicale e nel procollo si può includere furosemide per raggiungere il medesimo scopo<sup>32</sup>. La diuresi indotta da furosemide per la prevenzione di SHC è stata oggetto dello studio di Charney e collaboratori: l'incidenza di SHC era significativamente più bassa nei cani che ricevevano furosemide con ciclofosfamide (P<0.002) rispetto a quelli a cui veniva somministrata soltanto ciclofosfamide<sup>20</sup>.

Il MESNA (2-mercaptoetanosulfonato) è un protettore renale e vescicale che nel sangue viene rapidamente inattivato dall'ossidazione

a dimesna; a livello renale viene di nuovo convertito a mesna e si concentra nelle urine dove si lega ad acroleina, inattivandola e riducendone l'urotossicità<sup>64</sup>. In un inedito lavoro retrospettivo del 2014 gli autori si sono prefissati lo scopo di comparare, nei cani che ricevevano ciclofosfamide, l'efficacia del 2-mercaptoetanosulfonato con la diuresi indotta da furosemide per la prevenzione della SHC. 131 cani sono stati inclusi nello studio: 33 (gruppo 1) non ricevevano alcuna profilassi, 43 (gruppo 2) ricevevano MESNA e a 55 (gruppo 3) veniva somministrata furosemide. L'incidenza di SHC era di 12.1%, 2.3% e 1.8%, rispettivamente. I cani che non ricevevano misure di profilassi avevano maggiori possibilità di sviluppare cistite rispetto agli altri due gruppi (P = 0.03) e non c'era significatività statistica tra l'efficacia di MESNA e quella di furosemide (P= 1.00)<sup>64</sup>.

**Tabella 2.3.4-1 Tossicità uroteliale secondo i criteri VCOG (ripreso da 154 e modificato)**

<b>Grado</b>	<b>Descrizione</b>
<b>1</b>	Asintomatico, ematuria microscopica
<b>2</b>	Pollachiuria e disuria, ematuria macroscopica
<b>3</b>	Grave ematuria e disuria, indicata terapia medica e trasfusione.
<b>4</b>	Gravissima ematuria e disuria, necessita di terapia intravescicale

### **2.3.5 TOSSICITA' CUTANEA**

La tossicità dermatologica indotta da chemioterapia non è quasi mai fatale ma riduce notevolmente la qualità di vita dell'animale e deve essere prevenuta o trattata sintomaticamente. I tipi di tossicità più frequenti sono la necrosi tissutale da stravasamento accidentale del farmaco e il ritardo nella ricrescita del pelo. La necrosi tissutale localizzata è conseguente a stravasamento di vincristina, vinblastina, D-actinomicina, doxorubicina, dacarbazina e mitoxantrone con comparsa di flebite regionale, dolore, rossore e tumefazione della parte; nell'arco di 1-7 giorni (per alcaloidi della vinca) o 7-10 giorni (per doxorubicina) si ha desquamazione e comparsa di necrosi. La gravità dello stravasamento dipende da sede in cui avviene, chemioterapico fuoriuscito, concentrazione, quantità e tempo trascorso prima di iniziare un'opportuna terapia. Per prevenire questa spiacevole eventualità è opportuno utilizzare cateteri endovenosi di piccole dimensioni (22G-23G) e se il paziente è irrequieto o agitato va sedato prima di iniziare la procedura. Particolare attenzione va prestata ai pazienti debilitati o trattati frequentemente con chemioterapia perché presentano vasi fragili quindi è opportuno verificare la pervietà del catetere: bisogna controllare il flusso della soluzione fisiologica attaccata al paziente prima di inoculare il farmaco e aspettare qualche minuto per assicurarsi che l'arto non gonfi (in quel caso riposiziono l'ago cannula). In caso di stravasamento bisogna sospendere la somministrazione senza rimuovere l'ago e con un ago 27 G cercare di aspirare dalla zona quanto più farmaco possibile; a questo punto s'instillano 5 ml di bicarbonato di sodio 8,4 % e 2 ml di desametasone (alla concentrazione di 4mg/ml) e/o 1 ml di ialuronidasi<sup>77</sup>. Quest'ultimo composto è risultato utile per ridurre vistosamente il danno cutaneo

da doxorubicina in 6 cani; è stato somministrato settimanalmente fino alla scomparsa dei sintomi e si pensa che possa diminuire la viscosità dell'acido ialuronico quindi permettere una diminuzione della concentrazione locale del tossico<sup>128</sup>. Dopo queste procedure si rimuove l'ago e si applicano impacchi caldi (vinblastina, vincristina) per disperdere il farmaco nel torrente circolatorio, o freddi (doxorubicina, mitoxantrone, mecloretamina, D-actinomicina) per confinare localmente il farmaco, riducendone la tossicità. Nei giorni successivi si deve lavare quotidianamente la ferita con soluzione fisiologica ed è possibile applicare una pomata a base di antibiotici o cortisone. I bendaggi devono essere cambiati quotidianamente e in caso di infezione batterica è consigliabile fare una coltura con antibiogramma per scegliere l'antibiotico più adatto.

I farmaci citotossici responsabili di alopecia sono doxorubicina, daunorubicina, D-actinomicina ed etoposide ma questo effetto tossico si risolve poco tempo dopo la sospensione del farmaco<sup>29,137</sup>.



***Figura 2.3.5-1 Stravasamento di doxorubicina in un arto anteriore di cane 3 (A), 7 (B) e 21 giorni (C) post-infusione (ripreso da 137 e modificato)***

**Tabella 2.3.5-1 Tossicità dermatologica secondo i criteri VCOG (ripreso da 154 e modificato)**

<b>Grado</b>	<b>Descrizione</b>
<b>1</b>	Diradamento del pelo in siti localizzati, eritema localizzato, lieve prurito, scolorimento delle unghie
<b>2</b>	Generalizzato assottigliamento del mantello, eritema generalizzato apprezzabile soltanto ad accurato esame, iper-pigmentazione, prurito intenso, indebolimento delle unghie
<b>3</b>	Alopecia generalizzata, eritema generalizzato facilmente apprezzabile, ulcere, necrosi, eritema con desquamazione, prurito intenso, grave rush cutaneo, esfoliazione, perdita delle unghie, dolore
<b>4</b>	Ulcere o necrosi che richiedono un intervento chirurgico, dermatite generalizzata esfoliativa, ulcera bollosa, perdita delle unghie e interferenza con la normale attività quotidiana.

## **2.4 I PROTOCOLLI CHEMIOTERAPICI**

Scegliere di sottoporre il proprio animale a chemioterapia è, per molti proprietari, una decisione difficile e spesso fonte di preoccupazioni. Compito del medico veterinario nella fase preliminare è quello di consigliare il protocollo chemioterapico più indicato valutando le condizioni fisiche del paziente, lo stadio tumorale, le aspettative del proprietario e le relative preoccupazioni, discutendo approfonditamente del probabile decorso clinico della malattia, degli effetti collaterali dei farmaci e delle possibili complicazioni. Prima di iniziare qualsiasi protocollo bisogna fornire al proprietario precise informazioni circa i potenziali rischi di esposizione ai farmaci citotossici e, se viene effettuata una somministrazione orale (a casa), il proprietario deve seguire precise regole (ad esempio non spezzare le compresse e indossare dei guanti); come già accennato è fondamentale istruirlo sulla gestione del proprio animale e sulla corretta manipolazione di escreti e secreti: non esistono dati certi su eventuali tempi di escrezione dei farmaci ma in linea generale è da evitare il contatto con qualsiasi secreto/escreto dal primo giorno di trattamento fino ad un intervallo cautelare di circa un mese dopo l'ultimo trattamento<sup>103</sup>.

Il linfoma è una neoplasia sistemica e il pilastro terapeutico è rappresentato dalla chemioterapia, anche se a oggi, ottimi risultati sono stati raggiunti con la somministrazione adiuvante di un vaccino autologo o eterologo (argomento che verrà approfondito in seguito)<sup>46,80,104,105,127</sup>.

### **2.4.1 MONOTERAPIA VS POLICHEMIOTERAPIA**

Gli schemi terapeutici prevedono l'utilizzo di agenti in monoterapia o in polichemioterapia; la scelta dipende principalmente dall'esperienza del veterinario, dalla compliance del proprietario e dal tipo di linfoma. La maggior parte degli oncologi veterinari concorda nell'affermare che l'approccio polichemioterapico assicura un tempo di sopravvivenza maggiore, soprattutto se nel protocollo è inserita la doxorubicina<sup>55,147</sup>. Lo schema terapeutico che prevede associazione di ciclofosfamide, doxorubicina (Hydroxydaunorubicina), vincristina (Oncovin, nome commerciale negli USA) e prednisone, il cosiddetto protocollo CHOP, si associa ad un tasso di risposta più elevato (88-96 %), PFS più lungo (Progression-Free Survival, 212-282 giorni) e maggiore sopravvivenza (350-397 giorni, il 20-25 % circa dei cani sopravvive oltre i 2 anni dall'inizio del protocollo); il trattamento (alla luce di questi dati) rappresenta un motivo di soddisfazione per il proprietario e per il veterinario poichè si associa a un tasso di risposta elevato in breve tempo (in media circa 7-14 giorni) e durante il periodo di remissione l'animale gode di una buona qualità di vita (se si verificano effetti collaterali ai chemioterapici, nella maggior parte dei cani non sono di grave entità)<sup>75,147</sup>. Per i proprietari che non dispongono di tempo o denaro sufficienti a intraprendere un protocollo polichemioterapico, la monochemioterapia è una possibilità percorribile anche se non rappresenta il percorso migliore per prolungare l'aspettativa di vita del paziente. Il prednisone è un farmaco economico e facilmente reperibile ma rappresenta soltanto un palliativo con una sopravvivenza media che non supera le 4-8 settimane<sup>22</sup>. Il protocollo con doxorubicina in monoterapia è sicuramente un'alternativa migliore rispetto al prednisone<sup>9,54,126</sup>: anch'esso è un farmaco relativamente economico e

ben tollerato dalla maggior parte dei pazienti; questo protocollo, inoltre, permette di evitare all'animale stress ripetuti e al proprietario le visite settimanali incluse in un protocollo standard di induzione (con risparmio di tempo e denaro visto che questo farmaco viene somministrato ogni 3 settimane). Gli svantaggi di questo trattamento sono rappresentati dai possibili effetti collaterali (mielosoppressione, disturbi gastroenterici e sviluppo di cardiomiopatia dilatativa), dalla scarsa risposta dei pazienti affetti da linfoma T e dall'efficacia minore rispetto ai protocolli in polichemioterapia (come già spiegato nel capitolo 2.1 questi ultimi vantano diversi meccanismi di uccisione delle cellule tumorali e sono associati ad una minore possibilità di resistenza)<sup>22</sup>; in letteratura infatti sono riportati tassi di risposta inferiori (69-74% circa) con un periodo di remissione di circa 7 mesi rispetto all'approccio polichemioterapico con doxorubicina, prednisone, vincristina e ciclofosfamide (CHOP)<sup>54,97</sup>. A tale proposito però è importante sottolineare che in un lavoro di Simon e collaboratori, dove veniva messa a confronto l'efficacia della doxorubicina in monoterapia rispetto a un protocollo polichemioterapico (con doxorubicina, L-asparaginasi, vincristina, metotrexate, ciclofosfamide e prednisolone), non emergevano differenze né riguardo ai tempi di sopravvivenza totali ( $P=0.38$ ) né riguardo al tempo medio della prima remissione ( $P=0.63$ )<sup>126</sup>.

Un altro svantaggio di questo protocollo è rappresentato dalla scarsa risposta nei pazienti affetti da linfoma T: in un lavoro di Beaver e collaboratori è emerso che questi mostravano dei tassi di risposta inferiori del 50% rispetto ai pazienti affetti da linfoma B<sup>9</sup>.

In letteratura sono presenti diversi studi che valutano l'approccio monochemioterapico in induzione (comunque meno usato dai

veterinari)<sup>119</sup>. Un lavoro recente di Higginbotham e collaboratori ne ha valutato l'efficacia in cani affetti da linfoma multicentrico di tipo B. Lo studio comprendeva 17 cani a cui veniva somministrata una dose di 30 mg/m<sup>2</sup> di doxorubicina (mentre ad un cane di 6.6 kg ne veniva somministrato 1 mg/kg), in tre somministrazioni, con un intervallo di due settimane di distanza tra di loro; 14 su 18 pazienti (78%) avevano una risposta completa (o CR, valutata secondo i criteri VCOG come il 100% di riduzione dei linfonodi, non più palpabili; vedi capitolo 2.1.6). 1 paziente di questi 14 ha recidivato tra la seconda e la terza somministrazione mentre un altro paziente ha mostrato una risposta completa al trattamento ma è morto in seguito agli effetti collaterali del farmaco; 12 su 18 soggetti (67%) erano dunque in remissione alla fine del protocollo di induzione. Il tempo medio per indurre la prima remissione era 68.5 giorni con un TDR (Total Doxorubicin Remission) di 80.5 giorni e un tempo di sopravvivenza medio di 169.5 giorni. Se si considerano i 12 pazienti in CR alla fine del protocollo di induzione, il TDR e il tempo di sopravvivenza medi erano di 157.5 e di 273.5 giorni, rispettivamente<sup>54</sup>. Dati analoghi a questo studio emergono nel lavoro di Mustaers e collaboratori (tasso di risposta del 74%, durata della prima remissione di 147 giorni e tempo di sopravvivenza di 169.5 giorni)<sup>96</sup>.

**Tabella 2.4.1-1 Protocolli monochemioterapici (ripreso da 75 e modificato)**

<b>Farmaco</b>	<b>Schema somministrazione</b>	<b>di</b>	<b>Risultati</b>
<b>Prednisone</b>	1 mg/kg/ie o 20-40 mg/m <sup>2</sup> /die		SM 30-75 giorni
<b>Doxorubicina</b>	30 mg/m <sup>2</sup> ev ogni 21 giorni per 3-6 somministrazioni		CR in 59-85% dei cani, DFI 4,3-6,8 mesi, SM 5,7-9 mesi, tasso di risposta (CR, PR): 100% linfoma B e 50% linfoma T, in salvataggio: DFI 35-219

**SM: sopravvivenza media; CR: risposta completa; PR: risposta parziale; DFI: intervallo libero da malattia**

**Tabella 2.4.1-2 protocollo COP di induzione (ripreso da 75 e modificato)**

<b>Farmaco</b>	<b>Protocollo</b>
<b>Ciclofosfamide</b>	50 mg/m <sup>2</sup> po a giorni alterni per 8 settimane, oppure 50 mg/m <sup>2</sup> po per 4 giorni consecutivi per 8 settimane
<b>Vincristina</b>	0.5-0.75 mg/m <sup>2</sup> una volta a settimana per 8 settimane
<b>Prednisone</b>	20 mg/m <sup>2</sup> sid per 7 giorni poi a giorni alterni

**Tabella 2.4.1-3 Protocollo Madison-Wisconsin, schema 25 settimane (ripreso da 75 e modificato)**

<b>Farmaco</b>	<b>Protocollo</b>
<b>L-asparaginasi</b>	400 UI/Kg sc: settimana 1
<b>Vincristina</b>	0.5-0.7 mg/m <sup>2</sup> ev: settimane 1,3,6,8,11,15,19,23
<b>Ciclofosfamide</b>	250 mg/m <sup>2</sup> ev: settimane 2,7,13 e 21
<b>Doxorubicina</b>	30 mg/m <sup>2</sup> settimane 4,9,17 e 25.
<b>Prednisone</b>	2mg/kg po sid per 7 giorni, poi 1.5 mg/kg po per 7 giorni e infine 1 mg/kg po per altri 7 giorni

**Tabella 2.4.1-4 Protocollo Madison-Wisconsin 19 settimane (ripreso da 75 e modificato)**

<b>Farmaco</b>	<b>Protocollo</b>
<b>L-asparaginasi</b>	400 UI/Kg im: settimana 1
<b>Vincristina</b>	0.5-0.7 mg/m <sup>2</sup> ev: settimane 1,3,6,8,11,13,16,18
<b>Ciclofosfamide</b>	75 mg/m <sup>2</sup> po: settimane 2,7,12 e 17 per i primi 4 giorni della settimana
<b>Doxorubicina</b>	30 mg/m <sup>2</sup> settimane 4,9,14 e 19
<b>Prednisone</b>	2mg/kg po per 7 giorni, poi 1.5 mg/kg po per 7 giorni, poi 1 mg/kg per 7 giorni, infine 0.5 mg kg per i rimanenti 7 giorni.

## 2.4.2 PROTOCOLLI E STRATEGIE TERAPEUTICHE

La gestione dei pazienti con linfoma è suddivisa in diverse fasi o strategie terapeutiche:

- utilizzo di protocolli che prevedono una prima fase di induzione e una seconda fase di mantenimento.
- utilizzo di protocolli che associano chemioterapici diversi senza mantenimento per una durata complessiva minore di 6 mesi.
- Utilizzo dei protocolli che, dopo la fase di induzione, prevedano una fase di consolidamento.

La durata più idonea di un protocollo chemioterapico è una questione molto dibattuta: non esistono studi prospettici e randomizzati che determinano l'impatto della lunghezza del protocollo sulla *durata della prima remissione* o sui *tempi di sopravvivenza*<sup>119</sup>; i lavori scientifici presenti in letteratura analizzano protocolli che vanno dalle 6-8 settimane ai due anni circa, riportando analoghe risposte circa questi due parametri. Per diverse ragioni, incluse problematiche di natura economica e di qualità di vita del paziente, i protocolli più brevi sono spesso raccomandati ma può essere necessaria una fase di consolidamento al fine di ottenere una risposta completa (che ho nella maggior parte dei pazienti) ed eliminare la malattia minima residua<sup>22,43,75,107</sup>. In un lavoro di Regan in cui vengono intervistati 519 veterinari è emerso che il 50% si affida ad un protocollo di 24-28 settimane, il 10% usa un protocollo < di 16 settimane e 8% un protocollo maggiore di 19 mesi<sup>119</sup>.

### **2.4.3 I PROTOCOLLI CHEMIOTERAPICI: LA FASE DI INDUZIONE**

Durante la fase d'induzione si massimizza la dose di chemioterapico per ridurre velocemente la massa neoplastica al fine di ottenere una remissione completa della malattia e migliorare la qualità di vita dell'animale. Questa fase ha una durata diversa a seconda dello schema terapeutico utilizzato: nel protocollo COP (ciclofosfamide, vincristina, prednisone) dura 6-8 settimane, durante le quali i pazienti vengono visitati e sottoposti ad un esame emocromocitometrico di controllo una volta alla settimana; se non si sono verificati effetti collaterali ai farmaci il veterinario procede con una somministrazione endovenosa di chemioterapico (il periodo di induzione può allungarsi se si verificano effetti collaterali che impongono una sospensione temporanea dei farmaci). Durante questa fase, come già detto in precedenza, la maggior parte dei soggetti non sviluppa effetti collaterali (comunque nella maggior parte dei casi sono transitori e non invalidanti) e la soddisfazione del proprietario è elevata visto che assiste ad un rapido miglioramento del cane con una buona qualità di vita; al proprietario viene chiesto di tenere sotto controllo l'appetito e il livello di attività del proprio animale, di misurare le dimensioni dei linfonodi e di rilevare la temperatura rettale (la febbre è generalmente secondaria a neutropenia e sepsi)<sup>28</sup>.

In un lavoro recente di Regan e collaboratori, dove venivano intervistati 519 veterinari, il protocollo più utilizzato per questa fase risultava essere il CHOP con l'aggiunta di L-asparaginasi (51%)<sup>119</sup>: questo farmaco può essere associato al protocollo CHOP durante la fase di induzione anche se due studi hanno dimostrato che l'efficacia del trattamento non dipende dalla sua inclusione nel protocollo<sup>58,69</sup>; per questa ragione viene utilizzato da molti veterinari come farmaco di

salvataggio o, nel caso l'induzione porti soltanto ad una remissione parziale, come farmaco in grado di indurre rapidamente una remissione completa (fase di intensificazione)<sup>22</sup>. Sono molto usati e presenti in letteratura anche i protocolli COP o COAP, (che incorpora citosina arabinoside nello schema chemioterapico); in un lavoro del 2008 di Marconato e collaboratori veniva valutata, in presenza di linfomi V stadio (infiltrazione midollare), l'efficacia di questo farmaco (in regime mieloablativo) aggiunto ad un protocollo VCAA (L-asparaginasi, vincristina, ciclofosfamide e doxorubicina). Il trattamento di questi pazienti con la chemioterapia convenzionale è spesso associato a una breve durata di remissione e/o a una scarsa risposta terapeutica con una prognosi peggiore<sup>134</sup>. Lo studio prevedeva che i 17 soggetti venissero suddivisi in due gruppi (gruppo 1 e 2, di 8 e 9 cani rispettivamente): al gruppo 2 veniva somministrata citosina arabinoside in aggiunta al protocollo VCAA (diluata in 500 ml di soluzione fisiologica, in infusione continua IV per 5 giorni consecutivi alla dose di 150 mg/m<sup>2</sup>) mentre al gruppo 1 veniva somministrato il solo protocollo VCAA. Per prevenire i possibili effetti collaterali ematologici erano stati somministrati filgrastim, eritropoietina e profilassi antibiotica. I risultati di questo studio erano molto incoraggianti visto che i soggetti del gruppo 2 mostravano migliori tassi di risposta (gruppo 2 88.9% vs 25 % gruppo 1, P<0.01) e maggiori tempi di sopravvivenza (gruppo 2 243 giorni vs gruppo 1 72.5 giorni, P< 0.001)<sup>71</sup>.

Come già accennato in precedenza il protocollo CHOP risulta essere il più usato dai medici veterinari per indurre una remissione duratura del linfoma canino<sup>119</sup>. Questo tipo di trattamento prevede la somministrazione di ciclofosfamide (50 mg/m<sup>2</sup> PO), prednisone (20

mg/m<sup>2</sup> PO), vincristina (0,5-0,7 mg/m<sup>2</sup>) e doxorubicina (30 mg/ m<sup>2</sup> EV); questa associazione di farmaci è inclusa nel protocollo Madison-Wisconsin: esso può durare 19 o 25 settimane e non prevede la fase di mantenimento. Durante le 25 settimane (o 19 nel protocollo più breve) i farmaci in questione vengono alternati secondo un preciso schema settimanale (vedi tabella 2.4.1-3)<sup>43,55,62</sup>.

L'immunofenotipo è un fattore importante e da considerare al fine di scegliere il protocollo terapeutico iniziale più adeguato: il tipo T è associato ad una scarsa risposta terapeutica (quindi ad una prognosi peggiore, PFS di 52 giorni, tempo di sopravvivenza totale di circa 160 giorni)<sup>143</sup> rispetto al tipo B (PFS 153 giorni, sopravvivenza totale 330-350 giorni)<sup>116</sup>. In letteratura è riportato che pazienti affetti da linfoma T possono sviluppare delle aberrazioni cromosomiche e che queste aumenterebbero le loro possibilità di acquisire meccanismi di farmaco resistenza<sup>138</sup>. Gli agenti alchilanti non sono substrato di Pg-170 quindi l'approccio polichemioterapico con mecloretamina, procarbazine e lomustina può essere usato per indurre una prima remissione verso linfomi di tipo T<sup>119</sup>; in un lavoro di Brodsky gli autori hanno valutato l'efficacia del protocollo MOPP (mecloretamina, vincristina, prednisone procarbazine, il primo e l'ultimo farmaco sono agenti alchilanti) con aggiunta di L-asparaginasi nei confronti di questo immunofenotipo. Il tasso di risposta totale era del 98% (il 78% dei pazienti aveva una risposta completa mentre il 20% parziale) con un OST (tempo di sopravvivenza totale) di 270 giorni<sup>16</sup>. Risultati incoraggianti verso questo immunofenotipo sono emersi anche in un interessante lavoro di Rebhun dove veniva valutata l'efficacia del protocollo L-CHOP verso di essi. Lo studio includeva 24 cani sottoposti ad un protocollo L-CHOP (26 settimane); il tasso di risposta (CR) era molto buono, 21 cani su 24

mostravano una risposta completa (88% di loro), 2 mostravano una risposta parziale (8%) e solo un cane non rispondeva al trattamento (4%). Il PFS medio di questo lavoro (parametro calcolato dal primo trattamento effettuato fino alla prima recidiva) era 104 giorni con un tempo di sopravvivenza medio di 235 giorni<sup>116</sup>.

Se un cane viene sottoposto a terapia di induzione, ma si ottiene soltanto una remissione parziale, è consigliabile intensificare il protocollo con una o due somministrazioni di L-asparaginasi (10.000-20.000 UI/m<sup>2</sup> intramuscolo, ripetuta ad intervalli di 2-3 settimane). Questo farmaco andrebbe evitato in quei pazienti che presentano nella loro anamnesi episodi di pancreatite o in quelli ad alto rischio di pancreatite acuta (per esempio soggetti obesi)<sup>28</sup>.

#### **2.4.4 MANTENIMENTO O NON MANTENIMENTO?**

Dopo aver completato il protocollo di induzione è consigliabile ristadiare nuovamente il paziente per verificare la risposta ottenuta (esistono dei precisi criteri per valutare l'andamento della malattia, vedi cap. 2.1.6). Si parla di remissione completa se non c'è più evidenza clinica di linfoma e i linfonodi non sono più apprezzabili; in questo caso (all'incirca dopo 6-8 settimane se si effettua un protocollo COP) si può cominciare, a seconda del protocollo, il periodo di mantenimento con l'utilizzo di chemioterapici a dosaggio ridotto (somministrati a casa dal proprietario) per mantenere la remissione (si può rivalutare il paziente una volta al mese con visita clinica ed esame emocromocitometrico). Il medico veterinario deve istruire il proprietario a controllare assiduamente le dimensioni dei linfonodi del proprio animale quindi a segnalare eventuali effetti collaterali dovuti ai

farmaci. In questa fase può essere usato un protocollo LMP (generalmente si osserva un mantenimento della remissione per 3-6 mesi); i farmaci in questione (clorambucile, metotrexato e prednisone) vantano una tossicità molto bassa, un costo minore (se confrontato con la fase di induzione) facilità di somministrazione e meccanismi d'azione diversi (tutte caratteristiche importanti in questa fase). Non appena viene rilevato un aumento dei linfonodi esplorabili (ricidiva), al protocollo LMP si aggiunge un quarto farmaco (di solito la vincristina, al dosaggio di 0,5-0,75 m<sup>2</sup> ogni 1-2 settimane)<sup>28</sup>.

Come già accennato nel capitolo 2.4.2, non esistono studi prospettici e randomizzati che dimostrano l'efficacia di una terapia di mantenimento sul tempo di sopravvivenza e sulla durata della prima remissione. Detto ciò, in un importante lavoro di Garrett e collaboratori veniva valutata l'efficacia di un protocollo CHOP (di 6 mesi ma senza mantenimento, il protocollo Madison Wisconsin 25 settimane) su 53 cani affetti da linfoma multicentrico. Durata della prima remissione e tempi di sopravvivenza venivano comparati a quelli di un protocollo simile (ma con una fase di mantenimento prolungata) effettuato su 55 cani (gruppo di controllo anamnestic); dal confronto non emergevano differenze statisticamente significative (P = 0.2835 e P = 0.3365, rispettivamente) e non si evidenziava una tossicità maggiore rispetto al gruppo di controllo<sup>43</sup>. I lavori pubblicati con protocolli più brevi (senza mantenimento) mostrano risultati variabili; un protocollo L-CHOP di 15 settimane riportava un durata media della prima remissione di 140 giorni<sup>94</sup> rispetto ai 243 giorni ottenuti con un protocollo dose intenso di 12 settimane (dove però il 65% dei soggetti sviluppava neutropenia e sintomi gastroenterici)<sup>125</sup>.

#### **2.4.5 FASE DI REINDUZIONE DELLA REMISSIONE O DI SALVATAGGIO**

In tutti i pazienti con linfoma, sottoposti o meno a terapia di mantenimento, si assiste alla comparsa di recidiva (in media 3-6 mesi dopo l'inizio della fase di induzione); essa di solito presuppone la comparsa di cloni tumorali più resistenti ai chemioterapici rispetto alle cellule della neoplasia originaria (cloni MDR) e perciò rappresenta una vera e propria sfida terapeutica per il veterinario. In caso di recidiva, dunque, si può dare inizio alla fase di reinduzione della remissione utilizzando il protocollo utilizzato in precedenza ma tenendo conto che tanto più breve è l'intervallo tra fine del protocollo originario e recidiva (in genere < 2 mesi), tanto più basse sono le probabilità di successo<sup>147</sup>. In uno studio di Flory e collaboratori, la durata della seconda remissione era associata alla durata della remissione dopo chemioterapia iniziale: se la prima remissione aveva durata superiore di 289 giorni, la seconda durava mediamente 214 giorni (con un protocollo CHOP-based) in confronto con soli 98 giorni se la prima remissione aveva durata < di 289 giorni. Il 78 % dei cani di questo lavoro (74/95) mostrava una risposta completa al protocollo CHOP di reinduzione dopo aver completato il medesimo schema terapeutico per 6 mesi<sup>37</sup>. Possiamo dunque aspettarci, in pazienti che hanno completato i protocolli iniziali con un protocollo CHOP di 25 settimane (schema Madison-Wisconsin), tassi di reinduzione elevati (80-90%) con una durata media della prima remissione di 9-10 mesi<sup>37,43,113</sup>. Secondo Couto, inoltre, è possibile ottenere da 1 a 4 nuove remissioni in quasi tutti i cani<sup>28</sup>.

In alternativa è possibile utilizzare protocolli di salvataggio o "rescue" tenendo conto che la percentuali di remissione completa riportate in

letteratura oscillano moltissimo, in linea di massima tra 7 e 80 % per periodi di 1.5-2.5 mesi (risultati statisticamente peggiori rispetto ai protocolli di induzione)<sup>3,6,34,112,122</sup>. Nel caso si opti per questi schemi terapeutici è necessario includere nel protocollo farmaci non utilizzati in prima linea e possibilmente non substrato di P-gp 170; proprio per il fatto che non sottostanno a questo meccanismo di resistenza, gli agenti alchilanti (mecloretamina, clorambucile, melfalan, lomustina) sono oggetto di numerosi studi<sup>3,6,34,93,101,112,122</sup>. Anche in questo caso si possono usare farmaci in monoterapia o una combinazione di D-actinomicina, mitoxantrone, doxorubicina (se non faceva parte del protocollo iniziale), dacarbazina, lomustina, mecloretamina e procarbazine; alcuni esempi sono i protocolli MOPP (mecloretamina, vincristina, procarbazine e prednisone), D-MAC (D-actinomicina, citosina arabinoside, melfalan e desametasone) e LOPP (lomustina, vincristina, procarbazine e prednisone)<sup>3,34,112</sup>. La scelta di un protocollo rescue dipende da numerosi fattori come costo dei farmaci, tempo, tossicità ed esperienza del veterinario<sup>75,147</sup>.

**Tabella 2.4.5-1 Protocollo rescue D-MAC**

<b>Farmaco</b>	<b>Protocollo</b>
<b>Desametasone</b>	1 mg/kg po/sc: giorni 1-8
<b>Citosina arabinoside</b>	300 mg/m <sup>2</sup> sc/ev (in 4 h): giorno 1
<b>D-actinomicina</b>	0.75 mg/m <sup>2</sup> ev: giorno 1
<b>Melphalan</b>	20 mg/m <sup>2</sup> po sid: giorno 8

*Questo ciclo si ripete ogni 14 giorni fino all'ottenimento di remissione completa. Dopo 4 cicli si consiglia di sostituire melphalan con clorambucile allo stesso dosaggio per ridurre il rischio di mielosoppressione. Se si ottiene remissione completa dopo 5-8 cicli si interrompe. CR: 44%, DFI: 61 giorni*

**Tabella 2.4.5-2 Protocollo rescue MOPP**

<b>Farmaco</b>	<b>Protocollo</b>
<b>Mecloretamina</b>	3-6 mg/m <sup>2</sup> ev: giorni 1-8
<b>Vincristina</b>	0.75 mg/m <sup>2</sup> ev: giorni 1-8
<b>Procarbazina</b>	50 mg/m <sup>2</sup> po sid giorni 1-14
<b>Prednisone</b>	30-40 mg/m <sup>2</sup> po sid

*Prevede due cicli della durata di 28 giorni. Il giorno 29 si ricomincia da capo, somministrando tutti i farmaci fino alla chemioresistenza. CR: 31%; DFI: 63 giorni.*

## **2.5 ALTRE SOLUZIONI TERAPEUTICHE: L'IMMUNOTERAPIA**

L'immunoterapia attiva (vaccino antitumorale) consiste nel presentare al sistema immunitario dell'ospite, antigeni tumorali in forma più immunogena, correggendo in questo modo i deficit nella sorveglianza immunitaria (tolleranza) del paziente. Un'inefficiente presentazione degli antigeni tumorali al sistema immunitario dell'ospite potrebbe permettere alle cellule tumorali di aggirare la risposta immunitaria e portare così a una tolleranza verso la neoplasia stessa. Il vaccino rappresenta una forma specifica e attiva di immunoterapia in grado di evocare una risposta immunitaria contro le cellule neoplastiche; le cellule tumorali stesse, dunque, sono spesso usate come fonte di antigeni. L'avvento dell'immunoterapia e in particolare dei vaccini antitumorali si è accompagnato al timore che l'immunosoppressione indotta da chemioterapia potesse interferire con l'efficacia di tali terapie; in oncologia umana però si è osservato il contrario e alla recidiva, pazienti precedentemente trattati con vaccino e chemioterapia, riottennero remissione (in seguito a nuova chemioterapia) di maggiore durata<sup>17,80</sup>.

Uno dei primi studi in merito è stato quello di Jeglum (1988) in cui gli autori hanno testato l'efficacia di un vaccino autologo (tramite somministrazione intralinfatica) associato a trattamento chemioterapico L-CHOP; a 30 cani veniva somministrato il solo protocollo chemioterapico mentre i rimanenti 58 venivano trattati con chemioimmunoterapia (CI); i pazienti di quest'ultimo gruppo vantavano un significativo aumento della durata della prima remissione ma non c'erano differenze nel tempo di sopravvivenza totale fra i due gruppi<sup>59</sup>.

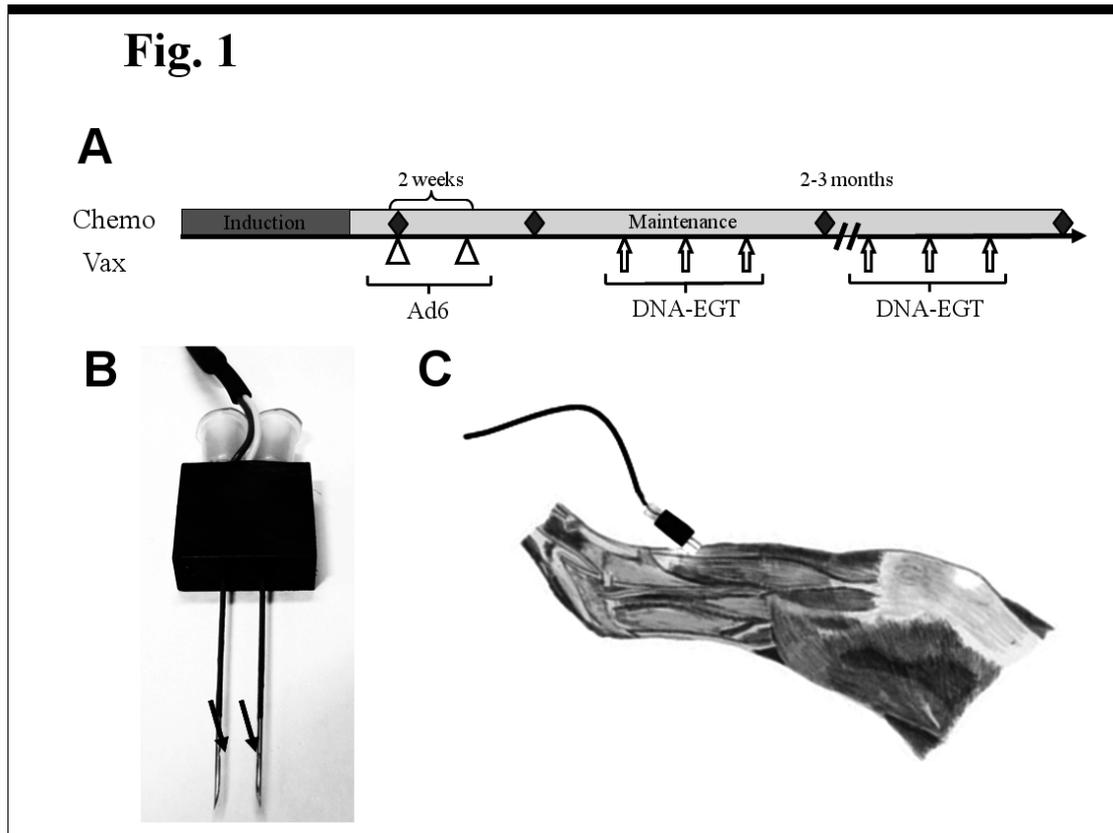
Uno studio di Turek e collaboratori (randomizzato, placebo-controllo e doppio cieco) descrive la messa a punto di un vaccino autologo a base di

fattori stimolanti le colonie granulocitiche-macrofagiche umane (hGM-CSF, human Granulocyte - Macrophag-Colony-Stimulating factor) associato ad un protocollo Madison-Wisconsin 19 settimane. Gli autori ipotizzano che l'uso di questo vaccino stimoli la risposta immunitaria al fine di aumentare la durata della prima remissione e i tempi di sopravvivenza totali in cani affetti da linfoma B. A 26 cani sono stati somministrati il protocollo chemioterapico e il vaccino mentre ad altri 26 cani è stato somministrato un placebo. Non sono state rilevate significatività statistiche nel confronto tra i due gruppi per quanto riguarda i tempi di sopravvivenza totali e la durata della prima remissione ma l'ipotesi testata, concludono gli autori, è sicuramente interessante e degna di studi futuri<sup>141</sup>.

La trascrittasi inversa telomerasica (TERT) è una ribonucleoproteina largamente confinata e sovraespressa nella maggior parte dei tumori (>90%) ma assente nella maggior parte dei tessuti sani del cane; per questa ragione TERT rappresenta un target valido per l'immunoterapia tumorale. E' stato osservato che i vettori genetici che esprimono dTERT sono capaci di indurre una risposta immunitaria contro l'antigene nei cani sani e che la procedura è sicura e priva di effetti collaterali<sup>104</sup>. Uno studio ha valutato la capacità dell'Adenovirus 6 (Ad6) e della DNA-elettroporazione (DNA-EP) di indurre una risposta immunitaria contro la dTERT in cani affetti da linfoma. Il vaccino genetico veniva combinato a un regime chemioterapico standard (COP: ciclofosfamide, vincristina e prednisone) e i soggetti venivano vaccinati in seguito alla remissione completa (durante la fase di mantenimento eseguita con ciclofosfamide e prednisone o con clorambucile e melfalan). Il protocollo prevedeva la somministrazione di  $10^{11}$  particelle di Ad6 (nel muscolo bicipite femorale) con un intervallo di 2 settimane per poi eseguire un ciclo di 5

DNA-EP, sempre con 2 settimane di intervallo. Un elettroporatore veniva utilizzato per immettere il vaccino nelle cellule muscolari (all'interno dei muscoli tibiali, con il paziente anestetizzato): il dispositivo libera un determinato quantitativo di corrente elettrica servendosi di un applicatore con un gruppo di aghi e facilita la penetrazione del vaccino nelle suddette cellule. Una risposta immune dTERT-specifica veniva indotta in 13 su 14 cani trattati (93%, affetti da linfoma multicentrico B, stadio WHO III-IV). Tale risposta avveniva in assenza di fenomeni autoimmuni o altri effetti collaterali; il tempo di sopravvivenza dei cani trattati con vaccino e chemioterapia era significativamente superiore rispetto ai controlli storici dei cani trattati soltanto con chemioterapia (rispettivamente > 97,8 settimane vs 37 settimane,  $P = 0.001$ ) mentre non si osservavano differenze nella durata della remissione. I risultati mostrano, concludono gli autori, che un vaccino genetico contro la dTERT basato sulla tecnologia Ad6/DNA-EP vince la tolleranza immunitaria dell'ospite, può essere associato alla chemioterapia, induce una risposta immunitaria cellulo-mediata di lunga durata (contro l'antigene tumorale) e prolunga significativamente il tempo di sopravvivenza dei pazienti canini affetti da linfoma<sup>105</sup>. Gli stessi autori, in uno studio caso controllo, hanno effettuato una prova clinica con un numero maggiore di pazienti affetti da linfoma in cui venivano valutati la risposta immunitaria antigene-specifica e i possibili effetti tossici dell'immunoterapia, oltre a un follow-up della sopravvivenza per 3,5 anni; 21 soggetti affetti da linfoma multicentrico di tipo B sono stati trattati con protocollo COP/vaccino mentre altri 21 soltanto con protocollo COP (analogamente a ciò che era stato fatto nel lavoro precedente). La risposta immunitaria è stata misurata mediante enzyme-linked immunospot assay e si quantificava l'espressione di dTERT mediante PCR quantitativa. Durante

il trattamento sono stati costantemente monitorati i parametri ematologici, la tossicità locale e sistemica, le disfunzioni organiche e la temperatura. La risposta immunitaria cellulo-mediata dTERT-specifica era indotta in quasi tutti gli animali trattati. Non si osservavano effetti avversi in nessun paziente. Il tempo di sopravvivenza complessivo dei cani trattati con vaccino/COP era significativamente aumentato ( $P < 0.0001$ ) rispetto ai soggetti trattati solo con COP (rispettivamente  $> 76,1$  vs.  $29,3$  settimane). S'identificava, inoltre, un'associazione significativa tra i livelli di espressione di dTERT nelle cellule tumorali e la sopravvivenza complessiva dei soggetti vaccinati. Da questi importanti lavori si può affermare con certezza che il vaccino tumorale contro dTERT basato su Ad/DNA-EGT associato al protocollo chemioterapico COP è sicuro e prolunga significativamente la sopravvivenza dei cani affetti da linfoma. Questi dati confermano l'efficacia terapeutica del vaccino dTERT e supportano la valutazione di questo approccio per altri tipi tumorali così come la traslazione agli studi clinici umani<sup>46</sup>.



**Figura 2.5.-1 Procedura Ad6/DNA-EP (ripreso da 46 e modificato)**

In un altro lavoro molto interessante, un vaccino sperimentale ha mostrato di poter indurre un prolungamento del tempo di sopravvivenza nei cani con linfoma; ai pazienti reclutati nello studio e con diagnosi di linfoma non-Hodgkin veniva somministrato un vaccino sperimentale (a base di linfociti B) dopo la chemioterapia standard e la conferma della remissione clinica. I linfociti B coltivati venivano prelevati dal sangue dei cani affetti dal tumore e nelle cellule veniva immesso RNA tumorale autologo, cioè isolato dal tumore del paziente stesso. L'obiettivo dello studio era di determinare se il vaccino prevenisse o prolungasse il tempo prima della recidiva; i cani sono stati vaccinati per tre volte a distanza di una settimana e poi sottoposti a follow up per alcuni anni. Sebbene i soggetti vaccinati mostrassero comunque recidive di malattia clinica (e venissero poi sottoposti a protocollo rescue), essi mostravano un

aumento significativo del tempo di sopravvivenza complessivo, rispetto ai cani non vaccinati. La vaccinazione potenziava gli effetti della chemioterapia di salvataggio e migliorava il tasso di seconde remissioni durature così come la sopravvivenza totale. I risultati indicano, osservano gli autori, che l'immunoterapia e la chemioterapia di salvataggio possono agire in maniera sinergica nel prevenire una seconda recidiva. I cani vaccinati e non vaccinati sviluppavano recidive nello stesso tempo, tuttavia il 40% dei cani vaccinati che recidivava andava incontro a una sopravvivenza a lungo termine dopo il secondo ciclo di chemioterapia, mentre solo il 7% dei cani non vaccinati che recidivavano (e che venivano trattati con la stessa chemioterapia di salvataggio) sopravvivevano a lungo termine; inoltre, quando i cani vaccinati e sopravvissuti a lungo termine morivano, non vi erano segni di linfoma all'esame necroscopico<sup>127</sup>.

In uno studio recente (randomizzato, placebo-controllo e doppio cieco) di Marconato e collaboratori è stata testata l'efficacia di un vaccino autologo combinato a un regime chemioterapico tradizionale. Le HSPs (Heat Shock Proteins) sono proteine sintetizzate dall'organismo in risposta a situazioni di stress cellulare (incluso il cancro) al fine di promuovere la sopravvivenza delle cellule stesse. Questi composti, inoltre, legano e presentano gli antigeni tumorali (o TAAs, tumor-associated antigens) alle APC (antigen presenting cells) attivando una risposta immunitaria da parte di linfociti T CD8+ e CD4+ mediante le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC di classe I e II). Le HSPs rappresentano "l'impronta" dei peptidi tumorali e sono pertanto uniche per ogni individuo; se isolate dal tumore di un certo paziente, possono stimolare l'immunità individuale, inducendo una risposta immunitaria specifica e non specifica. Il vaccino testato in questo lavoro è stato

generato con composto a base di HSPs e idrossiapatite (quest'ultima funge da corpo estraneo, attirando monociti e macrofagi nel sito di inoculo sottocutaneo). Mediante cromatografia, le HSPs sono assorbite sulla superficie dell'idrossiapatite, che quindi può veicolarle e presentarle alle cellule APC, stimolando così il sistema immunitario. Il trial terapeutico è stato condotto su 19 cani con linfoma B, sia aggressivo sia indolente. I cani sono stati randomizzati in doppio cieco: il gruppo 2 (7 cani) è stato trattato con polichemioterapia (protocollo di 20 settimane a base di L-asparaginasi, vincristina, ciclofosfamide, doxorubicina, lomustina e prednisone) e 0.5 ml di placebo mentre il gruppo 1 (12 cani) ha ricevuto l'immunostimolatore (iniezione di 0.5 ml sottocute) e il medesimo protocollo di chemioterapia. Per questo studio è stata necessaria l'asportazione di un linfonodo periferico per ottenere il materiale biologico necessario alla preparazione dello stimolatore autologo e per avere un corretto inquadramento patologico. I risultati preliminari di questo lavoro sono molto incoraggianti e hanno dimostrato che l'utilizzo di questo immunostimolatore associato a chemioterapia nei cani con linfoma multicentrico B (senza stratificazione per stadio clinico e istotipo) garantisce tempi di remissione e di sopravvivenza prolungati rispetto ai soggetti trattati solo con chemioterapia, senza avere la comparsa di effetti collaterali (tempo di progressione della malattia: 304 giorni gruppo 1 vs 92 giorni gruppo 2,  $P = 0.0004$ ; tempo di sopravvivenza medio: 505 giorni gruppo 1 vs 148 giorni gruppo 2,  $P = 0.0018$ )<sup>80</sup>.

## ***PREMESSA***

La parte sperimentale di questo lavoro è stata realizzata selezionando le cartelle cliniche di cani affetti da linfoma multicentrico in cura presso due strutture diverse: l'Ospedale Didattico Veterinario "Mario Modenato" (OD), Dipartimento di Scienze Veterinarie, dell'Università di Pisa e la Clinica Veterinaria "Valdinievole" (CV) di Monsummano Terme.

Sono state selezionate 24 cartelle cliniche su 148 totali (80 presso l'Ospedale Didattico e 68 presso la Clinica "Valdinievole"): soltanto in 24 pazienti canini che hanno intrapreso il protocollo terapeutico completo è stato possibile collezionare informazioni relative ad ogni settimana di protocollo circa la comparsa di effetti collaterali conseguenti alla somministrazione dei chemioterapici (eventi avversi che venivano segnalati dai proprietari o che emergevano dagli esami di laboratorio).

Lo scopo di questa tesi è stato quello di comparare la frequenza degli effetti collaterali o avversi più comuni riportati in letteratura scientifica (neutropenia, anemia, trombocitopenia, febbre, vomito, diarrea, perdita di peso e anoressia) manifestati dai pazienti a seguito della somministrazione di due trattamenti chemioterapici diversi, eseguiti presso due centri oncologici; i due protocolli (Madison-Wisconsin e COP, descritti in seguito con i relativi dosaggi) sono stati valutati per la comparsa di effetti collaterali durante le prime 9 settimane, mettendoli così a confronto. La valutazione dei risultati può fornire alcuni interessanti spunti di riflessione per eventuali approfondimenti tra cui la segnalazione degli effetti avversi più comuni, la loro presenza e gravità nei due protocolli impiegati e gli accorgimenti impiegati per limitare i loro effetti clinici indipendentemente dall'efficacia del trattamento contro la malattia linfomatosa.

## **3 MATERIALI E METODI**

Per realizzare questo studio sono stati selezionati 24 cani nel periodo compreso fra il 2007 al 2014: 13 di loro sono stati sottoposti al protocollo chemioterapico COP (Ciclofosfamide, Vincristina e Prednisone) presso l'Ospedale Didattico Veterinario "Mario Modenato" dell'Università di Pisa mentre 11 sono stati curati presso la Clinica Veterinaria "Valdinievole" di Monsummano Terme, dove è stato utilizzato il protocollo Madison-Wisconsin.

### **3.1 CASISTICA**

Non in tutti i casi diagnosticati di linfoma nelle due strutture è stato possibile ottenere dai proprietari la disponibilità a intraprendere un programma terapeutico completo: l'impegno necessario alla somministrazione puntuale ed efficace dei farmaci, l'attenzione alla gestione degli escreti dei propri animali e la prospettiva di una terapia solo palliativa e non curativa ha infatti scoraggiato molti di loro. Tra quelli diagnosticati di linfoma (148 casi in tutto), dunque, in ragione dello scopo di questo lavoro, sono stati presi in considerazione soltanto i pazienti che hanno effettuato la chemioterapia presso le due strutture e per i quali è stato possibile ricostruire un follow-up dettagliato relativo alle prime 9 settimane di trattamento. I casi poco dettagliati, privi di informazioni utili o quelli in cui la terapia è stata svolta presso altre strutture, non sono stati selezionati per questa ricerca.

Tutti i proprietari che hanno deciso di sottoporre il proprio animale al protocollo terapeutico hanno firmato un consenso informato dove

venivano avvertiti circa gli eventuali effetti collaterali della terapia quindi su come gestire gli escreti dei propri animali.

La casistica oggetto di studio, come è possibile desumere dalla tabella sottostante, presenta una prevalenza di pazienti al IV stadio della stadiazione clinica WHO (vedi capitolo 1.3.5

**Tabella 3.1-1 Segnalamento dei pazienti e tipi di linfoma**

	<b>Clinica veterinaria “Valdinievole”</b>	<b>Ospedale didattico “M. Modenato”</b>
<b>Linfoma grado II</b>	1 paziente: -Dogue de Bordeaux maschio 6 anni	0 pazienti
<b>Linfoma grado III</b>	1 paziente: -Barboncino maschio 8 anni	0 pazienti
<b>Linfoma grado IV</b>	7 pazienti: -Bull Dog Inglese maschio 3 anni -meticcio maschio 10 anni -Pastore Maremmano femmina 10 anni -Golden Retrievier maschio 9 anni -Golden Retrievier maschio 12 anni -Dobermann, femmina 11 anni -Dobermann femmina 11 anni	11 pazienti: -Beagle maschio 4 anni -Dobermann maschio 6 anni -Jack Russell Terrier maschio 3 anni -meticcio femmina 7 anni -meticcio maschio 11 anni -meticcio maschio 12 anni -meticcio maschio 8 anni -meticcio maschio 9 anni -Dobermann femmina 6 anni -Labrador femmina 9 anni -Segugio italiano femmina 6 anni
<b>Linfoma grado V</b>	2 pazienti: -meticcio femmina 10 anni -meticcio femmina 8 anni	2 pazienti: -meticcio maschio 5 anni -Lupo Cecoslovacco femmina 6 anni

Al fine di ottenere un congruo numero di casi, i pazienti non sono stati selezionati per aspetto citologico, immunofenotipo e grado di linfoma e sono piuttosto eterogenei dal punto di vista del segnalamento; la casistica si compone di 21 casi di linfoma B e 2 casi di linfoma T mentre ad un cane in cura presso l'Ospedale "M. Modenato" non è stato possibile determinare l'immunofenotipo in quanto è deceduto dopo 4 settimane senza mai andare in remissione completa, manifestando quindi una completa refrattarietà al protocollo. I 2 casi di linfoma T sono stati diagnosticati e trattati presso la Clinica "Valdinievole". Per quanto riguarda i pazienti affetti da linfoma V stadio, 3 presentavano infiltrazione midollare (2 cani in cura presso l'Ospedale e 1 presso la Clinica) mentre 1 cane in cura presso la Clinica presentava coinvolgimento intestinale e vescicale.

A seguito all'esame citologico i tipi di linfoma sono stati classificati secondo lo schema di Kiel updated con una netta prevalenza del tipo centroblastico polimorfo a elevato grado di malignità:

- Clinica Veterinaria "Valdinievole": 7 casi con linfoma di tipo centroblastico polimorfo a elevato grado di malignità, 4 casi di linfoma a grandi cellule.
- Ospedale Didattico Veterinario "M. Modenato": 6 casi di tipo centroblastico polimorfo a elevato grado di malignità, 1 caso di tipo centroblastico monomorfo a elevato grado di malignità, 4 casi di tipo centroblastico a componente macronucleolata, 1 caso di tipo macronucleolato a grado intermedio di malignità.

### **3.1.1 PROTOCOLLO TERAPEUTICO IMPIEGATO PRESSO L'OSPEDALE DIDATTICO VETERINARIO "M. MODENATO"**

Presso questa struttura è stato impiegato un protocollo COP il quale prevede una fase di induzione di 8 settimane; durante questo periodo è stata somministrata vincristina (dosaggio di 0.75 mg/m<sup>2</sup>) con cadenza settimanale. Nei pazienti in cui si verificava una neutropenia grave (di grado VCOG III o IV) i clinici operanti in questa struttura sceglievano di posticipare la somministrazione di questo farmaco per poi ridurre il dosaggio (0.50/0.65 mg/m<sup>2</sup>), optando poi per una profilassi antibiotica a base di amoxicillina-acido clavulanico; a causa di ciò, in alcuni pazienti, il periodo di induzione si prolunga fino a 9 settimane. Il protocollo comprendeva inoltre la somministrazione di Ciclofosfamide (50 mg/m<sup>2</sup> PO a domicilio, dal proprietario), Prednisone (1 mg/kg PO a domicilio, dal proprietario) e di alcuni farmaci volti a impedire la comparsa degli effetti collaterali più comuni di questa terapia:

- Protettori gastrici → è stata impiegata la Ranitidina (0-5-2 mg/kg po), un antagonista dei recettori H<sub>2</sub> in grado di ridurre la secrezione acida gastrica al fine di proteggere la mucosa da ulcere o gastriti.
- Antiemetici → Maropitant Citrato (2 mg/kg) il giorno prima e due giorni dopo la chemioterapia effettuata presso la struttura.
- Complessi multivitaminici → integratori alimentari contenenti vitamine, minerali e proteine al fine di prevenire eventuale anemie di tipo carenziale e per migliorare la tenuta in condizioni di stress indotte dai trattamenti antineoplastici.

Nei pazienti in cui si è verificata una refrattarietà al protocollo standard è stata aggiunta la doxorubicina al dosaggio di 30 mg/m<sup>2</sup> da somministrare ogni 3 settimane; in un cane la vincristina è stata

sostituita con L-asparaginasi (200 UI/kg, SC) a causa degli effetti collaterali mostrati verso questo principio attivo.

### **3.1.2 PROTOCOLLO TERAPEUTICO IMPIEGATO PRESSO LA CLINICA VETERINARIA “VALDINIEVOLE”**

Presso la clinica veterinaria “Valdinievole” è stato somministrato un protocollo Madison Wisconsin, di 19 (in 5 pazienti) o 25 settimane (in 3 pazienti).

A 3 pazienti invece è stato somministrato un protocollo breve di 9 settimane.

Questi schemi terapeutici prevedevano la somministrazione dei seguenti farmaci con i relativi dosaggi impiegati:

- Vincristina → 0.7 mg/m<sup>2</sup> EV
- L-asparaginasi → 400 UI/kg IM
- Ciclofosfamide → 75 mg/m<sup>2</sup> PO;
- Doxorubicina → 30 mg/m<sup>2</sup> EV;
- Prednisone → 2, 1.5, 1 o 0.5 mg/kg a seconda della settimana di somministrazione, PO.

Il protocollo Madison-Wisconsin 19 e 25 settimane, eseguiti presso la Clinica “Valdinievole”, sono descritti nel capitolo 2.4.1

Il protocollo breve di 9 settimane prevedeva la somministrazione dei medesimi farmaci secondo lo schema elencato (nessuna somministrazione di farmaci alla quinta settimana):

**Tabella 3.2-3 Protocollo breve 9 settimane somministrato presso CV**

<b>Farmaco</b>	<b>Protocollo</b>
<b>L-asparaginasi</b>	400 UI/Kg im: settimana 1 e 6
<b>Vincristina</b>	0.5-0.7 mg/m <sup>2</sup> ev: settimane 2 e 7
<b>Ciclofosfamide</b>	75 mg/m <sup>2</sup> po: settimane 3 e 8 per i primi 4 giorni della settimana
<b>Doxorubicina</b>	30 mg/m <sup>2</sup> settimane 4 e 9
<b>Prednisone</b>	2mg/kg po per 7 giorni, poi 1.5 mg/kg po per 7 giorni, poi 1 mg/kg per 7 giorni, infine 0.5 mg/kg per i rimanenti 7 giorni.

In un paziente affetto da linfoma V stadio è stato deciso di aggiungere al protocollo la Citosina Arabinoside, diluita in 500 ml di fisiologica e in infusione continua EV per 5 giorni consecutivi alla dose di 150 mg/m<sup>2</sup>.

A tutti i pazienti in cura presso la clinica “Valdinievole” è stato somministrato, al fine di prevenire sintomi come nausea o vomito post chemioterapia, Maropitant Citrato al dosaggio di 2 mg/kg SC il giorno stesso della terapia, da continuare per 2 giorni successivi.

### **3.2 PROCEDIMENTO DIAGNOSTICO: VISITA CLINICA E AGO ASPIRATO LINFONODALE**

Per approdare a una diagnosi certa di linfoma è stato necessario ricorrere, in ambedue le strutture, a una visita clinica completa quindi all’esame citologico ottenuto mediante ago infissione linfonodale.

Entrambe le strutture si sono servite di colorazioni di May Grundwald-Giemsa o Diff Quik<sup>®</sup> per poi osservare i vetrini al microscopio al fine di classificare il linfoma dal punto di vista citologico (sulla base della classificazione di Kiel Updated).

### 3.3 STADIAZIONE CLINICA DELLA MALATTIA

Ogni paziente è stato sottoposto, in entrambi i centri oncologici, ad una serie di esami comprendente:

- emogramma completo
- profilo biochimico
- profilo coagulativo
- esame delle urine
- ago aspirato di fegato e milza (presso Clinica “Valdinievole”)
- prelievo e valutazione del midollo osseo
- immunofenotipizzazione
- ecografia addominale
- radiografia toracica
- elettroforesi delle proteine sieriche
- immunofluorescenza indiretta per *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia rickettsii*.

Il ricorso a questo pannello esteso di analisi ha permesso al veterinario di inquadrare clinicamente il paziente e di stadiare la malattia: la stadiazione rappresenta la valutazione dell'estensione anatomica di una neoplasia e permette di definire in modo standardizzato quanto essa sia voluminosa e diffusa al momento della diagnosi (confermata attraverso l'esame citologico). Questo processo inoltre è in grado di fornire informazioni utili circa una probabile prognosi e permette di impostare un protocollo terapeutico adeguato.

### 3.3.1 EMOGRAMMA

Il sangue ottenuto dal prelievo, effettuato dalla vena giugulare o dalla cefalica degli animali a digiuno, è stato conservato in provette addizionate di K3-EDTA. Sono stati valutati i seguenti parametri:

- RBC: n° eritrociti (M/ $\mu$ L);
- HCT: Ematocrito in %;
- HGB: Emoglobina in g/dL
- MCV: Volume corpuscolare medio in fL;
- MCH: Emoglobina corpuscolare media in pg;
- MCHC: Concentrazione Emoglobinica Corpuscolare Media in g/dL;
- RDW: Ampiezza di distribuzione eritrocitaria in %;
- WBC: n° Leucociti totali (K/  $\mu$ L);
- NEU: n° Neutrofili (K/  $\mu$ L);
- BAND: segnalata presenza di neutrofili banda;
- LYM: n° Linfociti (K/  $\mu$ L);
- MONO: n° Monociti (K/  $\mu$ L);
- EOS: n° Eosinofili (K/  $\mu$ L);
- BASO: n° Basofili (K/  $\mu$ L);
- PLT: n° Piastrine (K/  $\mu$ L);
- MPV: Volume Piastrinico Medio in fL;
- PCT: Piastrinocrito in %;
- PDW: Ampiezza di distribuzione piastrinica in %.

Lo strumento fornisce anche le % di Neutrofili, Linfociti, Eosinofili, Monociti e Basofili. Sul sangue prelevato si è inoltre allestito uno striscio ematico; il preparato è stato asciugato e successivamente colorato con Diff Quik<sup>®</sup> per poi essere letto al microscopio.

### **3.3.2 PROFILO BIOCHIMICO**

Il profilo biochimico è stato effettuato su siero. I test sono stati effettuati in chimica liquida e i parametri esplorati sono volti a indagare la funzionalità dei principali organi nell'ottica di una stadiazione quanto più dettagliata della malattia. Gli analiti dosati sono le proteine totali con frazioni albuminica e globulinica, i metaboliti (urea, creatinina, bilirubina totale, colesterolo totale, trigliceridi e glicemia), gli enzimi (AKP, GGT, AST, ALT, CK, LDH, amilasi e lipasi), gli elettroliti (fosfati, sodio, potassio e cloro) e i minerali (ferro e calcio totale).

### **3.3.3 PROFILO COAGULATIVO**

Al fine di valutare l'emostasi in ambedue le strutture si è determinato il Tempo di Protrombina (PT), il Tempo di Tromboplastina Parziale attivata (aPTT), il fibrinogeno (in mg/dL). La Clinica Veterinaria "Valdinievole" includeva nel pannello anche la determinazione dei D-Dimeri della fibrina (in µg/mL), degli FDP (in µg/mL) e dell'Antitrombina (in %).

### **3.3.4 ESAME DELLE URINE**

Il prelievo delle urine è stato effettuato per cistocentesi, per minzione spontanea e per cateterismo. Questo esame si compone di una valutazione di caratteri fisici (odore, colore, trasparenza, viscosità e peso specifico) e chimici (ottenuti attraverso l'utilizzo di strisce reattive urinarie: pH, glucosio, bilirubina, sangue, proteine, urobilinogeno, leucociti) con annessa determinazione del rapporto PU/CU. In ambedue le strutture è stato valutato il sedimento urinario.

### **3.3.5 AGO ASPIRATO DI FEGATO E MILZA**

Presso la Clinica “Valdinievole” è stata effettuato l’esame citologico di fegato e milza per mettere in evidenza un’eventuale coinvolgimento di questi organi quindi per poter stadiare la malattia.

### **3.3.6 PRELIEVO ED ESAME DEL MIDOLLO OSSEO**

Questo esame è stato effettuato su tutti i pazienti perchè rappresenta una tappa obbligata al fine di stadiare la malattia in atto, definire una probabile prognosi e impostare un protocollo terapeutico adeguato (che può variare se siamo di fronte ad un linfoma V stadio, secondo la classificazione WHO). Il fine di questo esame è quello di verificare se è presente un infiltrato di cellule neoplastiche a questo livello. L’ago-aspirato midollare è stato eseguito preferibilmente dalla cresta iliaca o in alternativa dallo sterno. La procedura prevede poi lo striscio dei vetrini e la lettura al microscopio previa colorazione.

### **3.3.7 IMMUNOFENOTIPIZZAZIONE**

Questa metodica rappresenta un passaggio fondamentale per stabilire una prognosi; come già ampiamente discusso nella prima parte di questo lavoro, i linfomi di tipo B vantano una prognosi migliore rispetto al fenotipo T quindi è importante per il clinico poter contare su questa indagine. Questo esame prevede l’utilizzo di anticorpi monoclonali grazie ai quali è possibile determinare alcune molecole di membrana specifiche, la cui espressione è ben riconosciuta in differenti tipi cellulari o in specifici stadi di differenziazione e attivazione; gli anticorpi utilizzati

sono stati per i linfociti B i CD21 e CD79 (panB), per i linfociti T, invece, anticorpi anti CD3, CD4 e CD8. Il marker CD34 è stato usato per discriminare la leucemia dal linfoma V stadio. Tale indagine si effettua a partire da una porzione del campione del prelievo linfonodale, conservato in una provetta apposita di PBS.

### **3.3.8 ECOGRAFIA ADDOMINALE**

Questo esame è stato eseguito al fine di completare il processo di stadiazione e mettere in evidenza un eventuale coinvolgimento epatico, splenico o dei linfonodi presenti in cavità addominale.

### **3.3.9 RADIOGRAFIA TORACICA**

Questo esame è stato eseguito in entrambe le strutture al fine di evidenziare un coinvolgimento mediastinico quindi per completare il processo di stadiazione.

### **3.3.10 ELETTROFORESI DELLE PROTEINE SIERICHE**

Questa tecnica permette di distinguere le varie frazioni proteiche e si basa sulla proprietà che hanno le proteine di migrare a velocità diversa in un campo elettrico a seconda della propria massa, dimensione, carica elettrica e forma. In questo modo si formano delle bande separate che corrispondono alle diverse frazioni proteiche.

### **3.3.11 IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA**

Questa tecnica è stata eseguita da entrambe le strutture al fine di ricercare gli anticorpi per *Leishmania Infantum*, *Ehrlichia Canis* e

*Rickettsia Rickettsii* così da poter escludere un coinvolgimento di questi parassiti nel processo linfoproliferativo.

### **3.4 FOLLOW UP SETTIMANALE**

I pazienti, durante il periodo oggetto di studio, si sono presentati settimanalmente presso le due strutture. L'iter prevedeva una visita completa (descritta nel capitolo 3.1) grazie alla quale il veterinario poteva valutare lo stato clinico del paziente e la risposta alla terapia in base alla diminuzione dei linfonodi esplorabili (vedi capitolo 2.1.6, valutazione della risposta alla chemioterapia); in questa occasione ogni proprietario veniva invitato a riferire quante più informazioni possibili riguardo alterazioni dello stato di salute del proprio animale e se il cane aveva sviluppato effetti collaterali post-chemioterapia. Le informazioni fornite dai proprietari rappresentano una parte fondamentale di questo lavoro insieme alle alterazioni emerse dall'emocromo; questo esame è stato eseguito ogni settimana prima di effettuare la chemioterapia così i clinici delle due strutture potevano verificare se il proprio paziente aveva sviluppato citopenie periferiche (in particolare gravi neutropenie, ritenute pericolose se associate a febbre) per valutare l'ipotesi di posticipare/ridurre la somministrazione del farmaco.

### **3.5 CLASSIFICAZIONE DEGLI EFFETTI COLLATERALI OGGETTO DI STUDIO**

Gli effetti collaterali oggetto di studio sono di natura ematologica (neutropenia, anemia e trombocitopenia), gastroenterici (vomito, diarrea, anoressia) e non gastroenterici (perdita di peso e febbre). Sono

stati classificati secondo 5 gradi di un preciso schema dettato dal Veterinary Cooperative Oncology Group<sup>154</sup> (classificazione descritta nella parte generale di questa tesi per quanto riguarda gli effetti avversi ematologici e gastroenterici).

La febbre è stata classificata sulla base della temperatura rettale rilevata alla visita clinica:

- Grado 0: assenza di febbre (temperatura < 39.5°)
- Grado 1: da 39.6° a 40°
- Grado 2: da 40.1° a < 41°
- Grado 3: da 41.1° a < 42°
- Grado 4: > 42°
- Grado 5: morte del soggetto

La perdita di peso è stata classificata in base al rilievo del peso effettuato alla visita clinica settimanale e si classifica in tre gradi:

- Grado 1: perdita di peso dal 5 al 10% del valore basale
- Grado 2: perdita > 10% al 15% del valore basale
- Grado 3: perdita > del 15% del valore basale

Sono state apportate soltanto due piccole modifiche al suddetto schema per quanto riguarda l'anemia e la perdita di peso: per anemia di grado 1 si intende HCT da 30% fino all'intervallo di riferimento + diminuzione degli eritrociti rispetto all'intervallo di riferimento mentre per perdita di peso di grado 0 si intende nessun dimagrimento o < del 5% del valore basale rilevato a T0.

### **3.6 INDAGINE STATISTICA**

I pazienti sono stati classificati in base ai gradi VCOG che manifestavano a ogni settimana oggetto di studio per poi eseguire il calcolo % dei casi

rispetto al totale (per questo è stato usato Excel 2008); è stato poi usato il test di Fisher (MedCalc®) per rilevare eventuali significatività statistiche e per confrontare i pazienti delle due sedi che manifestavano quel grado con i pazienti che, invece, non manifestavano quel grado specifico.

## **4 RISULTATI**

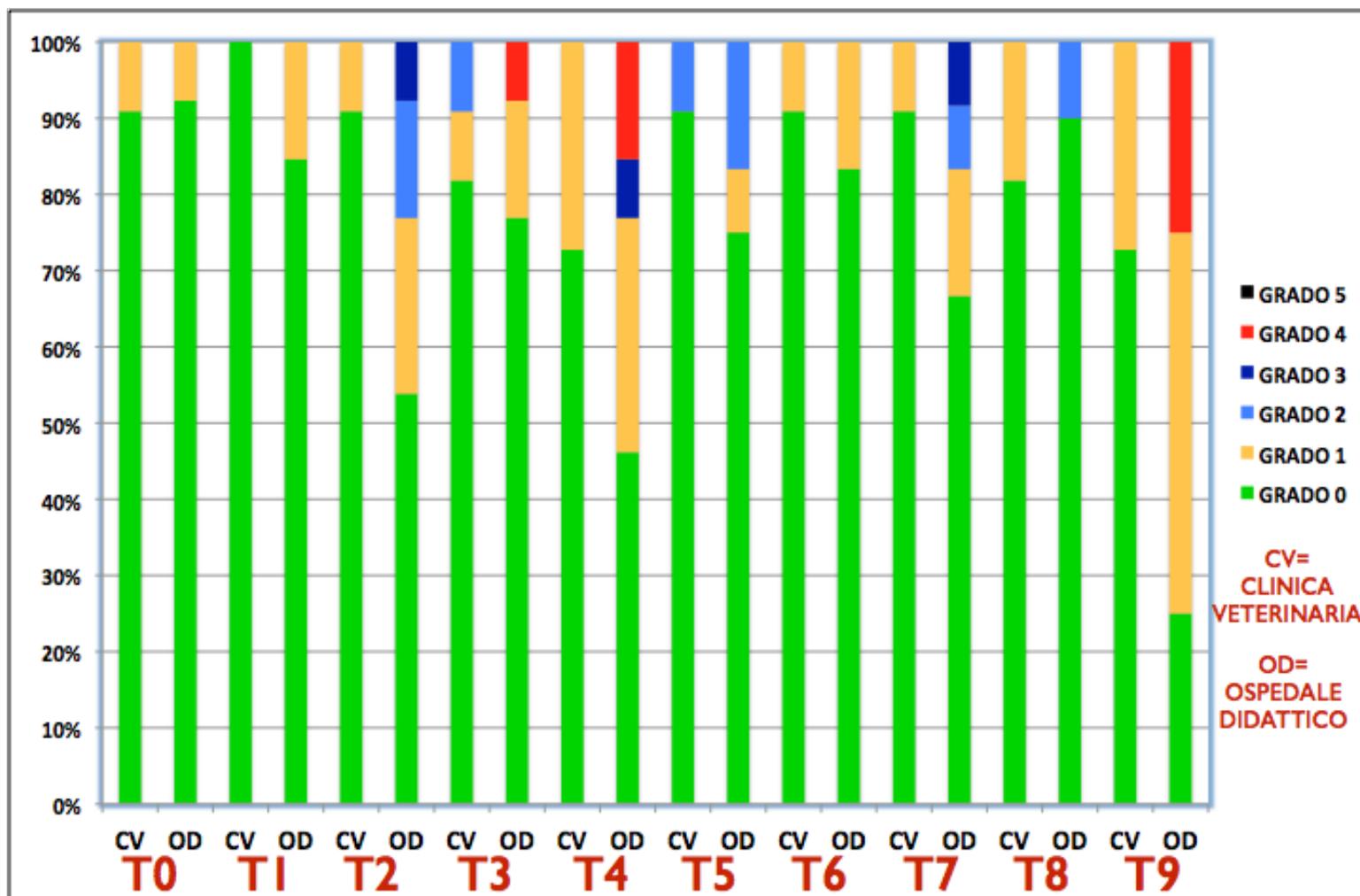
### **4.1 PREMESSA**

Questo lavoro si compone di una casistica di 24 pazienti ma non tutti hanno completato lo studio: un paziente in cura presso l'Ospedale Didattico "M. Modenato" (OD) è deceduto dopo 4 settimane dall'inizio della terapia mentre 2 soggetti hanno completato il protocollo di induzione COP a 7 settimane; 4 pazienti, invece, hanno dovuto prolungare la terapia fino alla nona settimana in quanto avevano sviluppato neutropenia ed è stato necessario posticipare la somministrazione dei chemioterapici. Tutti i pazienti in cura presso la Clinica Veterinaria "Valdinievole" (CV) completano lo studio. Per ogni settimana (indicata come T) è stata calcolata la % di pazienti che hanno o non hanno (se di grado 0) sviluppato effetti collaterali.

### **4.2 EFFETTI SULL'EMOGRAMMA**

#### **4.2.1 NEUTROPENIA**

11 pazienti (85%) in cura presso l'Ospedale didattico "M.Modenato" e 7 (55%) presso la clinica "Valdinievole" hanno sviluppato questo effetto collaterale



*Figura 4.2.1-1 Confronto tra i pazienti con diversi gradi di neutropenia.*

**T0:** il 9% dei pazienti del gruppo CV (1 cane) ha sviluppato una neutropenia di grado 1 mentre il 91 % di loro non ha manifestato questo effetto collaterale (10 cani). Nel gruppo OD le % sono simili con 12 pazienti di grado 0 (92%) e un solo paziente di grado 1 (8%). Dal confronto fra le due sedi non sono emerse differenze statisticamente significative ( $P=1$ ).

**T1:** nel gruppo CV nessun paziente ha sviluppato questo effetto collaterale mentre il 15% dei pazienti del gruppo OD ha una neutropenia di grado 1, l'85% di loro invece è di grado 0 (2 e 11 cani, rispettivamente). Dal confronto fra le due sedi non sono emerse differenze statisticamente significative ( $P=0.48$ ).

**T2:** nel gruppo CV il 91% dei pazienti (10 cani) non mostra questo effetto collaterale mentre il 9% di loro (1 cane) ha una lieve neutropenia di grado 1; nel gruppo OD invece 7 soggetti (54%) non hanno sviluppato questo sintomo, il 23% (3 cani) ha una lieve neutropenia di grado 1, il 15% (2 cani) ha una neutropenia di grado 2 e l'8% ha una neutropenia di grado 3 (1 cane). In questa settimana non emergono differenze statisticamente significative ( $P= 0.077$  per il grado 0, 0.59 per il grado 1, 0.48 per il grado 2 e 1 per il grado 3).

**T3:** nel gruppo CV l'82% dei pazienti non ha sviluppato neutropenia (9 cani), il 9% ha una neutropenia di grado 1 (1 cane) e il rimanente 9% di grado 2 (1 cane). Nel gruppo OD il 77% dei pazienti non mostra questo effetto collaterale (10 cani su 13), il 15% ha una lieve neutropenia di grado 1 (2 cani) mentre l'8 % ha sviluppato una grave neutropenia di grado 4 (1 solo cane). Anche in questo caso non si rileva significatività statistica ( $P=1$  per il grado 0 e grado 1,  $P=0.45$  per il grado 2 e  $P=1$  per il grado 4).

**T4:** nel gruppo CV il 73% dei pazienti non ha sviluppato questo evento avverso mentre il 27% ha una neutropenia di grado 1 (3/11 pazienti); nel gruppo OD la situazione è più eterogenea: 46% di grado 0 (6 pazienti), 31% grado 1 (4 pazienti), 8 % grado 3 (1 paziente) e 15% grado 4 (2 pazienti). Non emerge una differenza statisticamente significativa con  $P=0.23$  per il grado 0,  $P=1$  per il grado 1 e grado 3,  $P=0.48$  per il grado 4.

**T5:** Nel gruppo CV il 91% dei pazienti (10 di loro) non ha sviluppato neutropenia mentre il 9% ha una neutropenia di grado 2 (1 solo soggetto); nel gruppo OD: 75% di grado 0 (9/12 pazienti), 8% grado 1 (1 paziente) e 17% grado 2 (2 pazienti). Non emerge, anche in questo caso, una differenza statisticamente significativa:  $P= 0.59$  per il grado 0,  $P=1$  per il grado 1 e per il grado 2.

**T6:** nel gruppo CV il 91% dei pazienti non mostra questo effetto collaterale mentre il 9% di loro ha una neutropenia di grado 1 (10 vs 1 solo paziente); nel gruppo OD, invece, l'83% dei pazienti ha una neutropenia di grado 0 mentre il 17% ha una neutropenia di grado 1 (10 vs 2 pazienti). Da questo confronto non emerge significatività statistica:  $P=1$  per grado 0 e per grado 1.

**T7:** il 91% del gruppo CV non mostra questo effetto collaterale mentre il 9% manifesta una neutropenia di grado 1 (10 vs 1 paziente); nel gruppo OD la situazione è più eterogenea con 67%, 17%, 8% e 8% rispettivamente per il grado 0 (8 cani), grado 1 (2 cani) gradi 2 e 3 (1 cane). Dal confronto non emerge significatività statistica con  $P= 0.30$  per grado 0, e  $P=1$  per grado 1, 2 e 3.

**T8:** nel gruppo CV l'82% dei pazienti (9 cani) non ha sviluppato neutropenia mentre il 18% di loro ha una neutropenia di grado 1 (2 cani). Nel gruppo OD il 90% non mostra questo effetto collaterale mentre il 10 % ha una neutropenia di grado 2 (9 cani e 1 cane, rispettivamente).

La significatività statistica non emerge:  $P=1$ , 0.47 e 0.47 rispettivamente per grado 0, 1 e 2.

**T9:** nel gruppo CV il 73% dei pazienti non ha sviluppato neutropenia mentre il 27% di loro ha una lieve neutropenia di grado 1 (8 vs 3 cani); nel gruppo OD i pazienti che hanno prolungato il protocollo fino a questa settimana sono 4: 25% grado 0, 50% grado 1 e 25% grado 4 (rispettivamente 1, 2 e 1 paziente). La significatività statistica non emerge:  $P=0.23$  per il grado 0,  $P=0.56$  grado 1 e  $P=0.26$  grado 4.

#### **4.2.2 ANEMIA**

11 pazienti (85%) in cura presso l'Ospedale didattico "M.Modenato" e 9 (82%) presso la clinica "Valdinievole" hanno sviluppato questo effetto collaterale.

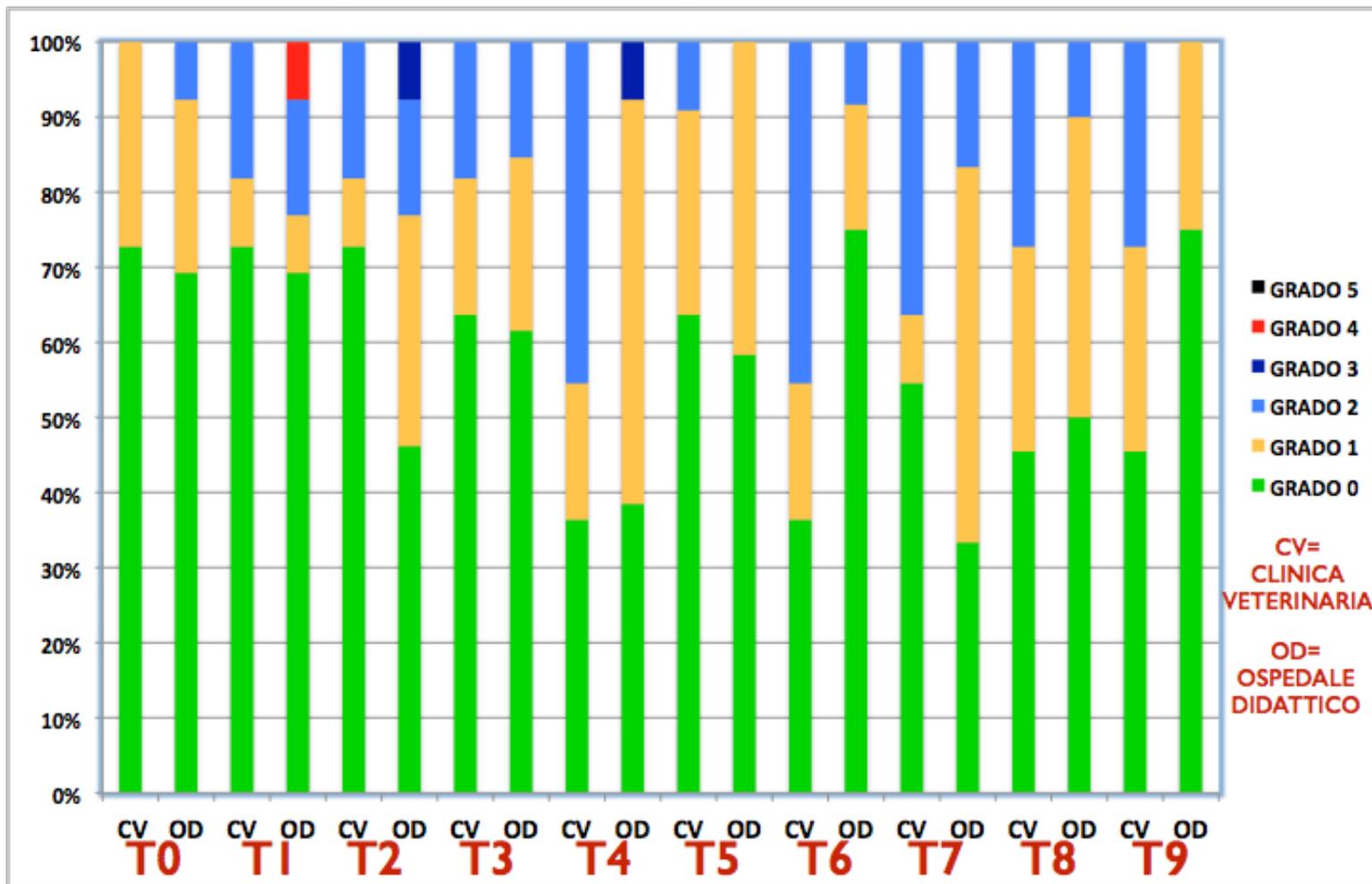


Figura 4.2.2-1 Confronto fra i pazienti con diversi gradi di anemia

**T0:** nel gruppo CV il 73% dei pazienti non ha sviluppato anemia mentre è presente un'anemia di grado 1 nel 27% dei pazienti (3 casi); nel gruppo OD il 69% dei pazienti non ha manifestato questo effetto collaterale, il 23% ha un'anemia di grado 1 e l'8% di grado 2 (rispettivamente 9, 3 e 1 paziente). Non emerge significatività statistica con  $P=1$  per grado 0, 1 e 2.

**T1:** nel gruppo CV il 73% dei pazienti (8 casi) non ha mostrato questo sintomo mentre il 9% e il 18% di loro ha sviluppato un'anemia di grado 1 e 2, rispettivamente (1 e 2 cani). Nel gruppo OD il 69% dei pazienti non ha sviluppato anemia, l'8% ha sviluppato un'anemia di grado 1, il 15% di grado 2 e l'8% di grado 4 (9, 2, 1 e 1 cane, rispettivamente). Non emerge significatività statistica con  $P=1$  per tutti e tre i gradi esaminati.

**T2:** nel gruppo CV i dati sono analoghi alla settimana precedente (73% grado 0, 9% grado 1 e 18% grado 2) mentre nel gruppo OD ci sono 46% dei pazienti di grado 0 (6/13), 31% grado 1 (4 pazienti), 15% di grado 2 (2 pazienti) e 8 % grado 3 (1 paziente). La significatività statistica non emerge nemmeno in questo caso con  $P=0.42, 0.32, 1$  e  $1$  rispettivamente per i gradi 0, 1, 2 e 3.

**T3:** nel gruppo CV il 64% dei pazienti non ha sviluppato anemia (7 pazienti), il 18% ha sviluppato un'anemia di grado 1 (2 pazienti) e il restante 18% di grado 2 (2 pazienti); nel gruppo OD ci sono 62% di pazienti di grado 0, 23% grado 1 e 15% grado 2 (8, 3 e 2 pazienti, rispettivamente). La significatività statistica non emerge ( $P=1$  per tutti i gradi esaminati).

**T4:** nel gruppo CV il 36% dei pazienti è di grado 0, il 18% di grado 1 e il 45% di grado 2 (4, 2 e 5 pazienti, rispettivamente) mentre nel gruppo OD il 38% non ha manifestato questo sintomo, il 54% ha un'anemia di grado 1 e l'8% di grado 3 (5, 7 e 1 paziente, rispettivamente). Non emergono differenze statisticamente significative per il grado 0, 1 e 3 ( $P=1, 0.1$  e  $1$ ,

rispettivamente) mentre, *per il grado 2, emerge una significatività statistica nel confronto tra le due sedi (P=0.010).*

**T5:** nel gruppo CV il 64% dei pazienti ha un'anemia di grado 0, il 27% di grado 1 e il 9% di grado 2 (7,3 e 1 paziente, rispettivamente); nel gruppo OD invece il 58% non ha manifestato questo sintomo mentre il 42% ha un'anemia di grado 1 (7 e 5 pazienti). Dal confronto non emerge significatività statistica (P=1, 0.66 e 0.47 per i gradi 0,1 e 2, rispettivamente).

**T6:** nel gruppo CV il 36% dei pazienti non ha manifestato questo sintomo mentre il 18% ha un'anemia di grado 1 e il 45% di grado 2 (4,2 e 5 cani, rispettivamente) mentre nel gruppo OD il 75% ha un'anemia di grado 0, il 17% di grado 1 e l'8% di grado 2 (9, 2 e 1 paziente, rispettivamente). La significatività statistica non emerge nemmeno in questo caso: P= 0.099, 1 e 0.068 per i gradi 0, 1 e 2, rispettivamente).

**T7:** nel gruppo CV il 55% dei casi ha un'anemia di grado 0, 9% di grado 1 e 36% di grado 2 (6, 1 e 4 pazienti, rispettivamente) mentre nel gruppo OD ci sono 33% di pazienti di grado 0, 50% di grado 1 e 17% di grado 2 (4, 6 e 2 pazienti); non emerge significatività statistica: P= 0.41, 0.068 e 0.37 per i gradi 0, 1 e 2, rispettivamente.

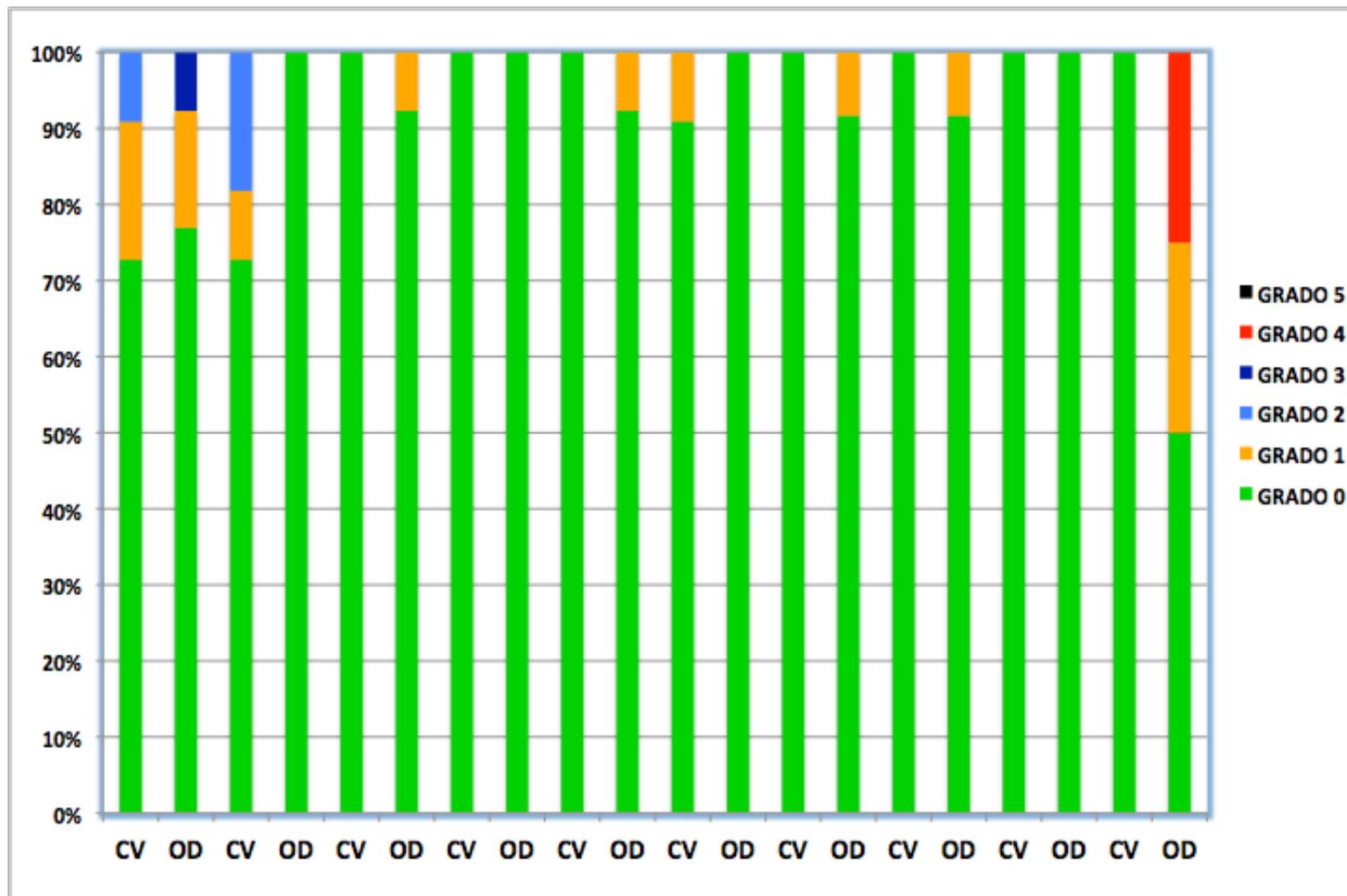
**T8:** nel gruppo CV il 45% dei pazienti ha un'anemia di grado 0, il 27% di grado 1 e 2 (8, 3 e 3 pazienti, rispettivamente) mentre nel gruppo OD le % sono di 50, 40 e 10 (5, 4 e 1 paziente). La significatività statistica non è emersa nemmeno da questo confronto: P=1 per il grado 0, 0.65 e 0.58 per il grado 1 e 2, rispettivamente.

**T9:** nel gruppo CV la situazione è la medesima della settimana precedente (45% grado 0, 27% gradi 1 e 2) mentre nel gruppo OD 75% di pazienti non hanno manifestato questo sintomo, il 25% ha un'anemia

di grado 1 (3 e 1 paziente, rispettivamente). Non emerge significatività statistica:  $P= 0.56, 1$  e  $0.51$  per i gradi 0, 1 e 2, rispettivamente.

#### **4.2.3 TROMBOCITOPENIA**

Questo effetto collaterale è stato sviluppato, in ambedue le sedi, da 4 pazienti (il 31% del gruppo San Piero e il 36% del gruppo Monsummano).



*Figura 4.2.3-1 Confronto tra i pazienti con diversi gradi di trombocitopenia*

**T0:** nel gruppo CV il 73% dei pazienti non ha sviluppato trombocitopenia mentre il 18 % ha una trombocitopenia di grado 1 e il 9% di grado 2 (8, 2 e 1 paziente, rispettivamente). Nel gruppo OD il 77% ha una trombocitopenia di grado 0, il 15% di grado 1 e l'8% di grado 3 (10, 2 e 1 paziente). La significatività statistica non emerge:  $P=1$  per grado 3, 0.45 per il grado 2.

**T1:** nel gruppo CV il 73% dei pazienti ha una trombocitopenia di grado 0, 9% di grado 1 e 18% di grado 2 (8, 1 e 2 pazienti, rispettivamente) mentre nel gruppo OD nessun paziente ha sviluppato una trombocitopenia durante questa settimana di trattamento; non emerge significatività statistica:  $P=0.08$ , 0.45 e 0.19 per i gradi 0,1 e 2, rispettivamente.

**T2:** nel gruppo CV nessun paziente ha sviluppato trombocitopenia, nel gruppo OD il 92% non ha manifestato questo effetto collaterale mentre l'8% ha una trombocitopenia di grado 1 (12 vs 1 paziente). Non emerge significatività statistica:  $P=1$  per entrambi i gradi.

**T3:** nessun paziente ha sviluppato trombocitopenia durante questa settimana

**T4:** nessun paziente del gruppo CV ha sviluppato trombocitopenia mentre l'8% dei pazienti del gruppo OD ha una trombocitopenia di grado 1 (1 solo paziente); non emerge significatività statistica:  $P=1$  dal confronto dei gradi in questione.

**T5:** il 9% dei pazienti del gruppo CV ha sviluppato una trombocitopenia di grado 1 (1 solo paziente) mentre nessun paziente del gruppo OD ha sviluppato questo effetto collaterale;  $P=47$  per i gradi in questione, non emerge dunque significatività statistica.

**T6:** nessun paziente del gruppo CV ha sviluppato trombocitopenia mentre l'8% dei pazienti di OD ha una trombocitopenia di grado 1 (1 solo

paziente); non emergono significatività statistiche dal confronto dei due gradi,  $P=1$  per entrambi.

**T7:** nel gruppo CV non ci sono pazienti trombocitopenici mentre nel gruppo OD la situazione è analoga alla settimana precedente

**T8:** nessun paziente dei due gruppi ha sviluppato trombocitopenia durante questa settimana

**T9:** nessun paziente del gruppo CV ha sviluppato questo effetto collaterale mentre il 25% dei pazienti del gruppo OD ha una trombocitopenia di grado 4, il 25% di grado 1 e il 50 % di grado 0 (1, 1 e 2 pazienti, rispettivamente). Dal confronto delle due sedi relativamente al grado 0 emerge una significatività statistica ( $P=0.05$ ), mentre non emerge per i gradi 1 e 4 ( $P=0.3$  e  $0.26$ ).

## **4.3 EFFETTI COLLATERALI GASTROENTERICI**

### **4.3.1 VOMITO**

Il 46% dei cani del gruppo San Piero e il 27% di quelli del gruppo Monsummano hanno sviluppato questo effetto collaterale (6 vs 3).

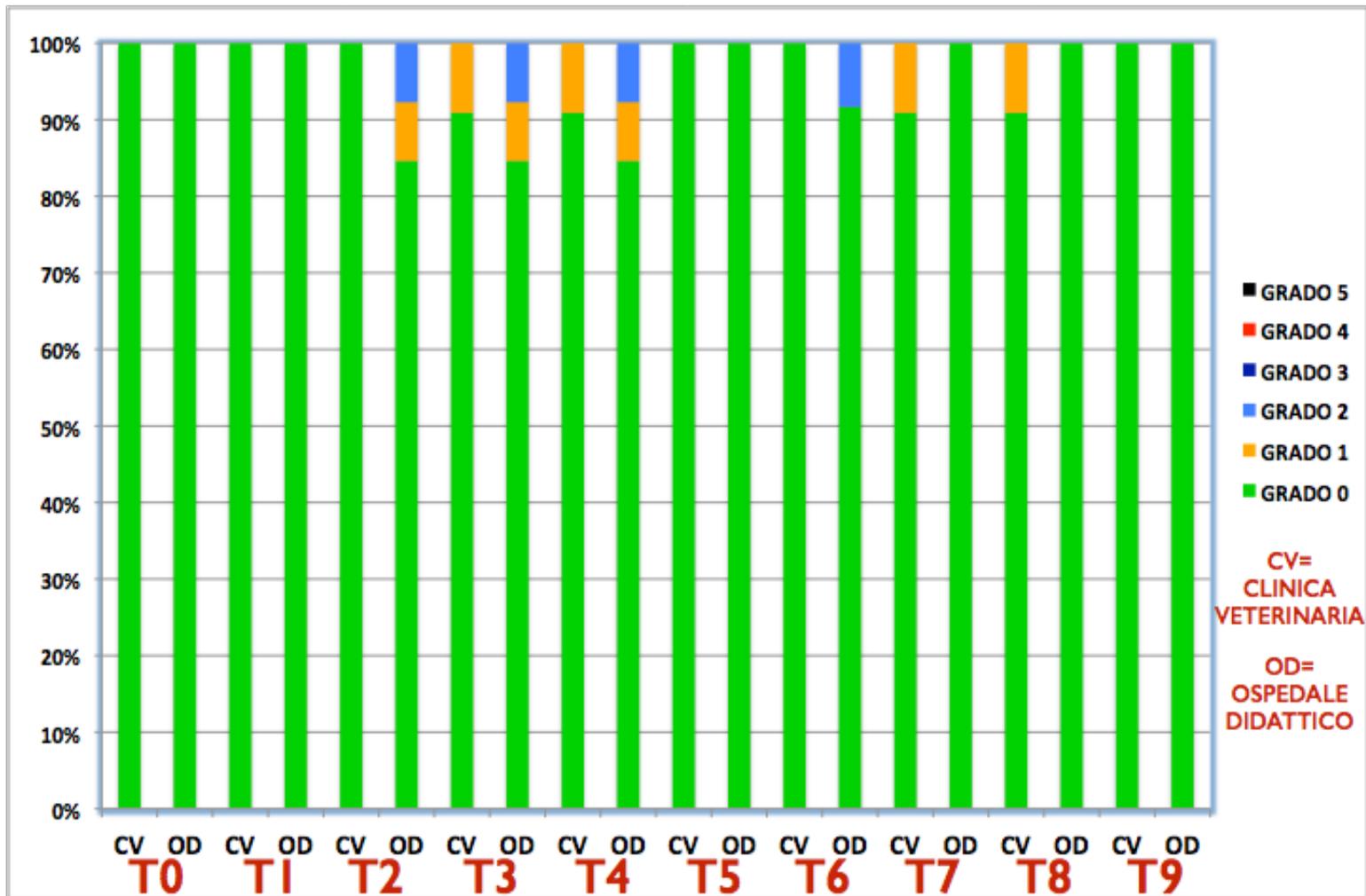


Figura 4.3.1-1 Confronto fra i pazienti con diversi gradi di vomito

**T0 e T1:** nessun paziente ha manifestato questo effetto collaterale durante le prime due settimane

**T2:** nessun paziente del gruppo CV ha sviluppato questo effetto collaterale così come l'85% del gruppo OD (11 cani); l'8% dei pazienti di OD ha manifestato vomito di grado 1 e il restante 8% di grado 2 (1 paziente grado 1 e 1 paziente grado 2). Dal confronto non emerge significatività statistica:  $P=0.48$  per il grado 0 e  $P=1$  per i gradi 1 e 2.

**T3:** il 91% dei pazienti del gruppo CV non ha sviluppato questo effetto collaterale mentre il 9% ha manifestato vomito di grado 1 (10 vs 1 paziente); nel gruppo OD la situazione è la medesima della settimana precedente (85% grado 0, 8% gradi 1 e 2). La significatività statistica non emerge:  $P=1$  per tutti e tre i gradi.

**T4:** in entrambi i gruppi la situazione è la medesima della settimana precedente.

**T5:** nessun paziente ha manifestato questo effetto collaterale durante questa settimana di trattamento

**T6:** nel gruppo CV nessun paziente ha manifestato questo effetto collaterale mentre nel gruppo OD un solo paziente ha sviluppato vomito di grado 2 (8% del totale). La significatività statistica non emerge:  $P=1$  per entrambi i gradi.

**T7:** Nel gruppo CV un solo paziente ha manifestato vomito di grado 1 (8%) mentre nessun cane del gruppo OD ha manifestato questo effetto collaterale. Dal confronto fra le due sedi non emerge significatività statistica ( $P=0.47$  per entrambi i gradi).

**T8:** Nel gruppo CV la situazione è la stessa della settimana precedente (1 solo paziente ha sviluppato vomito di grado 1) mentre nessun paziente del gruppo OD ha manifestato questo effetto collaterale (0/10).

**T9:** nessun paziente ha sviluppato questo effetto collaterale durante l'ultima settimana oggetto di studio.

#### **4.3.2 DIARREA**

Durante il periodo oggetto di studio il 36% dei pazienti di CV e il 23% dei pazienti di OD ha sviluppato questo effetto collaterale (rispettivamente 4 e 3 cani).

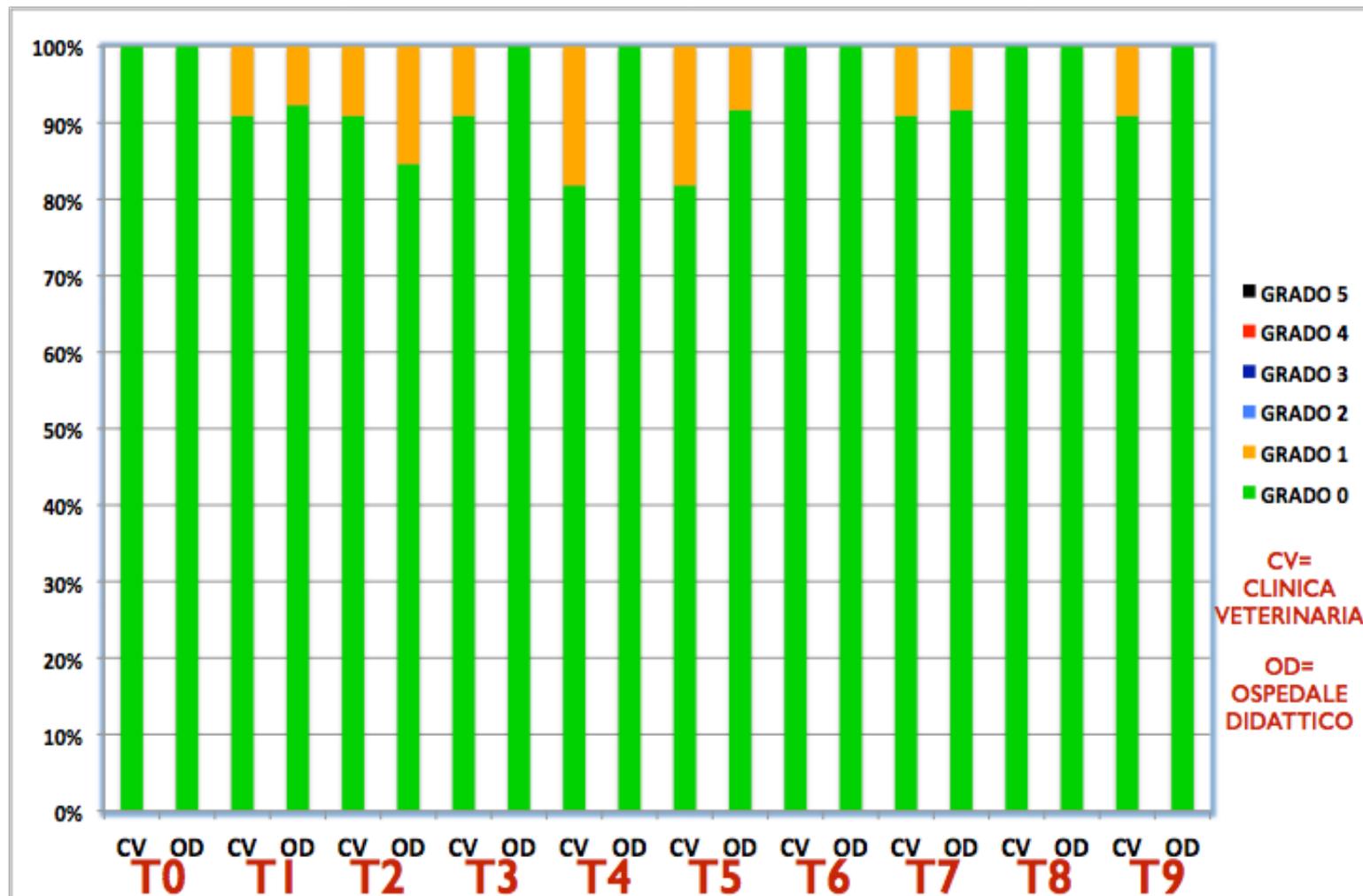


Figura 4.3.2-1 Confronto fra i pazienti con diversi gradi di diarrea

**T0:** nessun paziente ha avuto diarrea durante questa settimana.

**T1:** il 91% dei pazienti del gruppo CV non ha sviluppato diarrea mentre soltanto il 9% ha avuto diarrea di grado 1 (10 pazienti e 1 solo paziente, rispettivamente); nel gruppo OD la situazione è simile: 1 solo paziente ha sviluppato diarrea di grado 1 (8%), mentre 12 pazienti non hanno manifestato questo effetto collaterale. La significatività statistica non emerge:  $P=1$  per entrambi i gradi confrontati.

**T2:** nel gruppo CV la situazione è analoga alla settimana precedente (91% grado 0 e 9% grado 1); nel gruppo OD il 15% ha sviluppato una diarrea di grado 1 mentre l'85% non mostra questo effetto avverso (2 vs 11 cani). La significatività statistica non emerge ( $P=1$  per entrambi i gradi).

**T3:** nel gruppo CV un solo cane ha manifestato questo sintomo (9% grado 1 vs 92% grado 0) mentre nel gruppo OD nessun cane ha avuto diarrea; dal confronto non emerge significatività statistica ( $P=0.45$  per entrambi i gradi).

**T4:** nel gruppo CV l'82% non ha manifestato questo effetto avverso mentre il 18% ha sviluppato una diarrea di grado 1 (9 vs 2 cani); nel gruppo OD, anche durante questa settimana, non si è verificato questo effetto collaterale. La significatività statistica non emerge dal confronto:  $P=0.19$  per entrambi i gradi.

**T5:** nel gruppo CV la situazione è analoga alla settimana precedente (82% grado 0 e 18% grado 1) mentre nel gruppo OD un solo cane ha sviluppato diarrea di grado 1 (92% grado 0 e 8% grado 1). La significatività statistica non emerge:  $P=0.59$  per i gradi 0 e 1.

**T6:** nessun cane ha sviluppato questo effetto collaterale.

**T7:** la situazione è analoga per entrambi le sedi: 1 solo paziente ha sviluppato diarrea di grado 1 (1/11, 9% del gruppo OD e 1/12, 8% del

gruppo CV). La significatività statistica non emerge per nessun grado confrontato ( $P=1$ ).

**T8:** nessun cane ha sviluppato questo effetto collaterale.

**T9:** nel gruppo CV ci sono 91% dei pazienti grado 0 e 9% grado 1 (10 vs 1 cane) mentre nessun cane del gruppo OD ha sviluppato questo effetto avverso. Dal confronto non emerge significatività statistica ( $P=1$  per entrambi i gradi).

#### **4.3.3 ANORESSIA/DISORESSIA**

Il 55% dei pazienti di CV e il 46% dei pazienti di OD ha manifestato anoressia/disoressia durante le 9 settimane oggetto di studio (6 pazienti in ambedue le sedi).

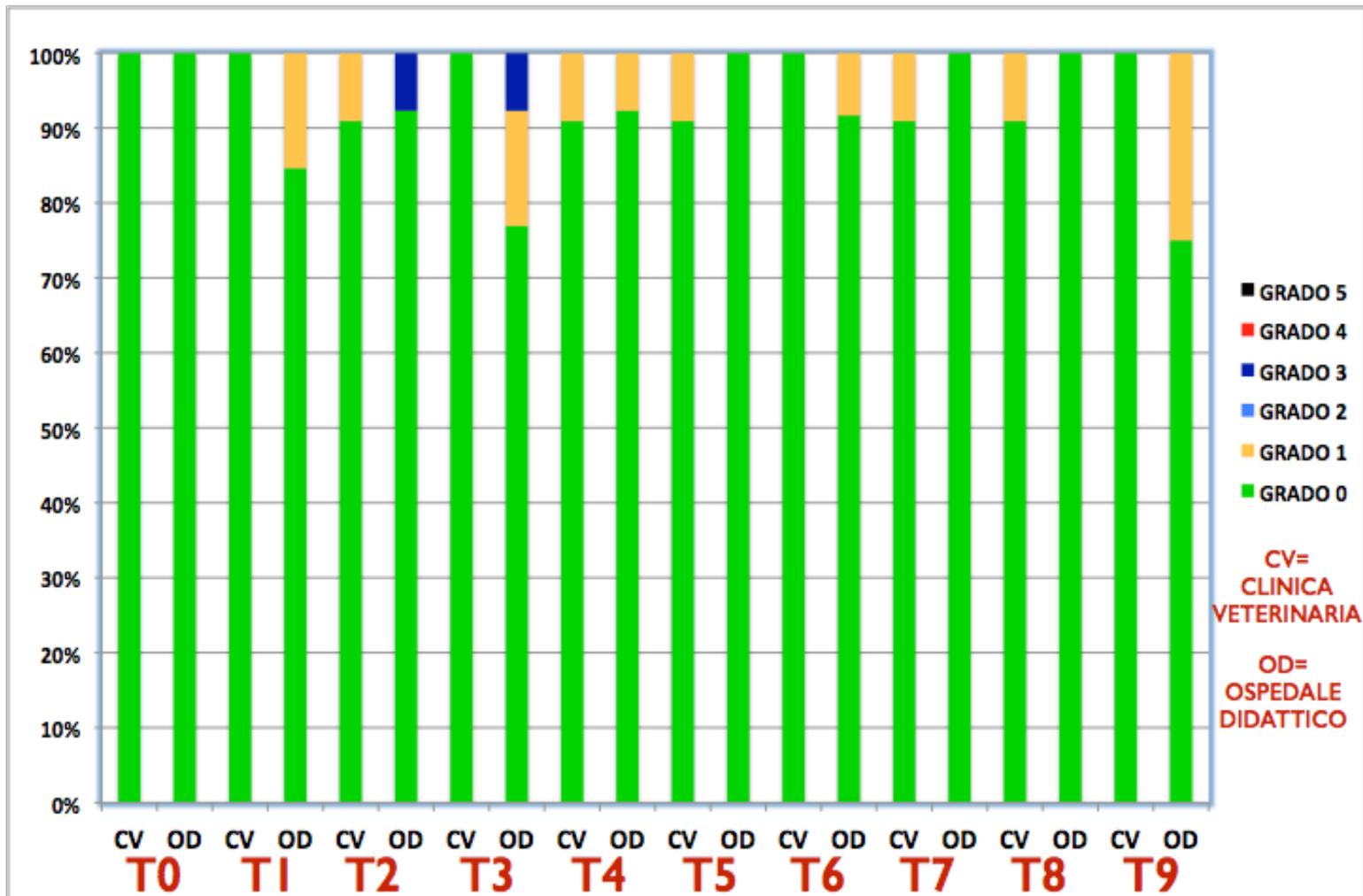


Figura 4.3.3-1 Confronto fra i pazienti con diversi gradi di anoressia/disoressia

**T0:** nessun paziente ha manifestato questo effetto collaterale durante questa settimana

**T1:** nel gruppo CV nessun paziente ha sviluppato questo effetto collaterale; nel gruppo OD l'85% di pazienti non ha manifestato anoressia mentre il 15% di loro mostrano un'anoressia di grado 1 (11 e 2 pazienti, rispettivamente). La significatività statistica non emerge:  $P=0.48$  per entrambi i gradi oggetto di confronto.

**T2:** il 91% dei pazienti del gruppo CV non hanno sviluppato questo effetto collaterale mentre 1 di loro ha un'anoressia di grado 1 (9%); nel gruppo OD 12 pazienti non mostrano questo effetto collaterale (92%) mentre 1 di loro ha un'anoressia di grado 3 (8%). Dal confronto non emerge significatività statistica con  $P=1, 0.45$  e  $1$  rispettivamente per i gradi 0,1 e 3.

**T3:** nessun paziente del gruppo CV ha mostrato questo effetto collaterale mentre nel gruppo OD la situazione è più eterogenea: 77% di pazienti di grado 0, 15% di grado 1 e 8% di grado 3 (rispettivamente 10, 2 e 1 paziente). Non si evidenzia significatività statistica con  $P=0.22, 0.47$  e  $1$  per i gradi 0, 1 e 3 rispettivamente.

**T4:** nel gruppo CV il 91% dei pazienti non ha manifestato anoressia mentre il 9% ha un'anoressia di grado 1 (10 e 1 paziente, rispettivamente); nel gruppo OD la situazione è la medesima: 1 paziente di grado 1 (8%) e 12 pazienti di grado 0 (92%). Non si evidenzia significatività statistica:  $P=1$  per entrambi i gradi.

**T5:** nessun paziente del gruppo OD ha mostrato anoressia mentre solo il 9% del gruppo CV ha un'anoressia di grado 1 (1 solo paziente);  $P=0.47$  per entrambi i gradi, non emerge significatività statistica.

**T6:** nessun paziente del gruppo CV ha sviluppato questo effetto collaterale mentre nel gruppo OD il 92% è di grado 0 e l'8% di grado 1.  $P=1$  per entrambi i gradi, non emerge significatività statistica.

**T7:** nessun paziente del gruppo OD Piero ha mostrato questo effetto collaterale mentre un solo paziente del gruppo CV ha un'anoressia di grado 1 (9%). Non emerge significatività statistica,  $P=0.47$  per entrambi i gradi.

**T8:** nessun paziente del gruppo OD ha mostrato questo effetto collaterale mentre nel gruppo CV la situazione è la stessa della settimana precedente: 9% di pazienti grado 1 e 91% grado 0.

**T9:** nessun paziente del gruppo CV ha sviluppato anoressia mentre nel gruppo OD il 75% ha un'anoressia di grado 0 (3 pazienti) e il 25% di grado 1 (1paziente).

## **4.4 EFFETTI COLLATERALI NON GASTROENTERICI**

### **4.4.1 FEBBRE**

Il 23% dei pazienti del gruppo OD e il 36% dei pazienti del gruppo CV ha manifestato questo sintomo durante le 9 settimane oggetto di studio (3 e 4 pazienti, rispettivamente).

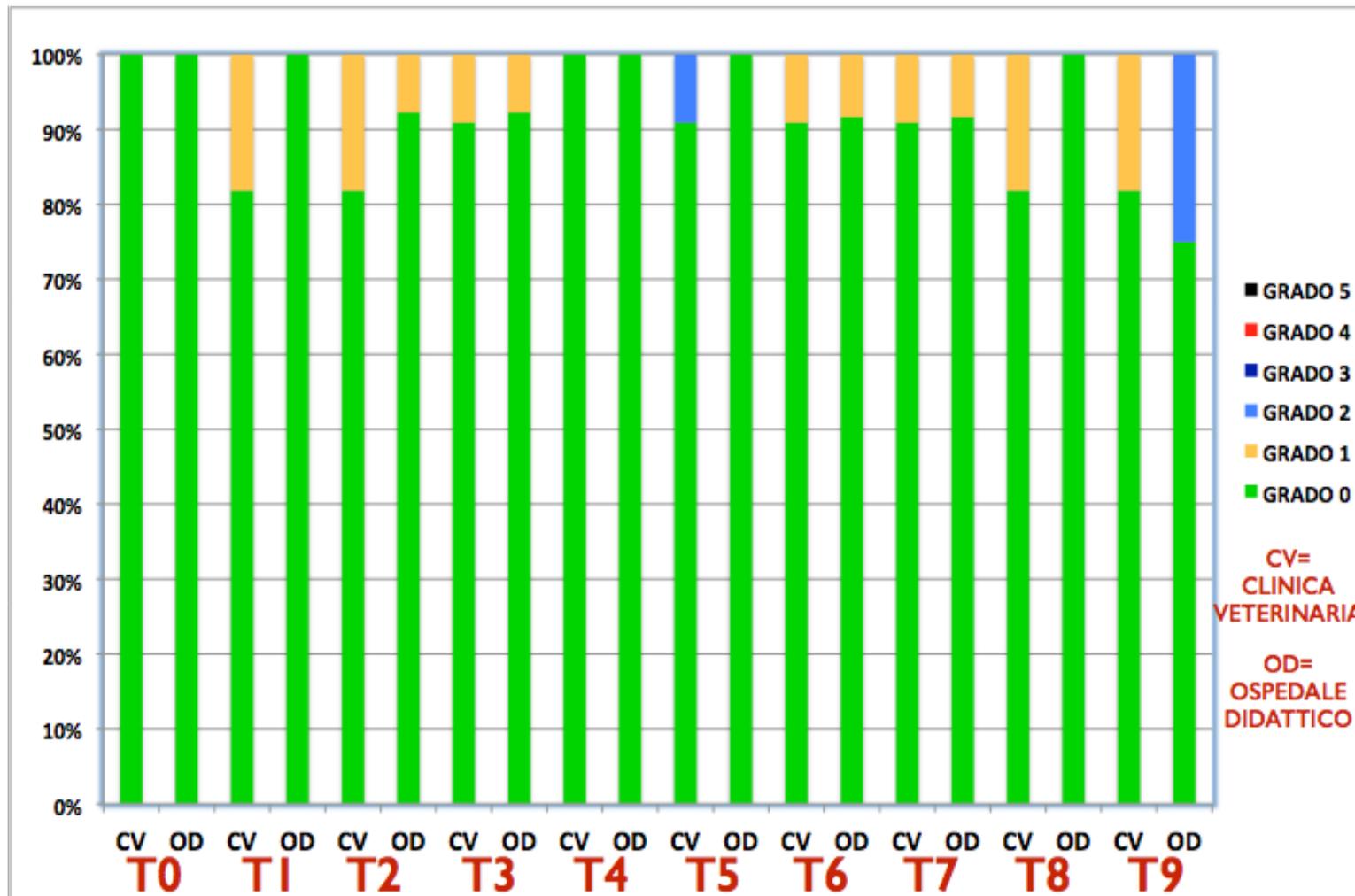


Figura 4.4.1-1 Confronto fra i pazienti con diversi gradi di febbre

**T0:** nessun paziente ha avuto febbre durante la prima settimana oggetto di confronto.

**T1:** durante questa settimana l'82% dei pazienti del gruppo CV non ha avuto febbre mentre il 18% ha avuto febbre di grado 1 (9 e 2 pazienti, rispettivamente); nessun cane del gruppo OD ha manifestato questo effetto collaterale. Non emerge significatività statistica:  $P=0.19$  per entrambi i gradi.

**T2:** l'82% dei pazienti del gruppo CV non ha avuto febbre mentre il 18% ha avuto febbre di grado 1 (9 e 2 pazienti, rispettivamente); nel gruppo OD il 92% dei pazienti non ha mostrato questo effetto collaterale mentre l'8% ha febbre di grado 1 (1 solo paziente). Non emerge significatività statistica:  $P=0.57$  per entrambi i gradi

**T3:** il 91% dei pazienti del gruppo CV non ha sviluppato questo effetto collaterale mentre il 9% ha febbre di grado 1 (1 solo paziente); nel gruppo OD le % sono simili: 92% grado 0 (12 pazienti) e 8% (1 paziente) grado 1. Non si evidenzia significatività statistica:  $P=1$  per entrambi i gradi.

**T4:** nessun paziente ha mostrato questo effetto collaterale durante questa settimana

**T5:** nessun paziente del gruppo OD ha sviluppato questo effetto collaterale; nel gruppo CV il 91% non ha avuto febbre mentre il 9% ha febbre grado 2 (10 e 1 paziente, rispettivamente). Non emerge significatività statistica:  $P=0.47$  per entrambi i gradi.

**T6:** il 91% dei pazienti del gruppo CV non ha mostrato questo effetto collaterale, 1 solo paziente invece ha febbre di grado 1 (9%); nel gruppo OD i dati sono simili: 92% grado 0 (11 pazienti) e 8% grado 1 (1 solo

paziente). La significatività statistica non emerge:  $P=1$  per entrambi i gradi.

**T7:** nel gruppo CV il 91% dei pazienti non ha sviluppato questo effetto collaterale mentre l'9% ha febbre di grado 1 (10 e 1 paziente, rispettivamente); nel gruppo OD le percentuali sono simili: 92% grado 0 e 8% grado 1 (11 e 1 paziente, rispettivamente). La significatività statistica non emerge:  $P=1$  per entrambi i gradi.

**T8:** nel gruppo CV l'82% dei pazienti non ha manifestato questo sintomo mentre il 18% ha febbre di grado 1 (rispettivamente 9 e 2 pazienti); nessun paziente del gruppo OD ha sviluppato questo effetto collaterale. La significatività statistica non emerge:  $P= 0.47$  per entrambi i gradi.

**T9:** nel gruppo CV l'82% dei pazienti non ha manifestato questo sintomo mentre il 18% ha febbre di grado 1 (rispettivamente 9 e 2 pazienti); nel gruppo OD il 75% dei pazienti (3 cani) non ha avuto febbre mentre il 25% ha sviluppato febbre di grado 2 (1 cane). La significatività statistica non emerge:  $P=1,1$  e  $0.26$  per i gradi 0, 1 e 2, rispettivamente.

#### **4.4.2 PERDITA DI PESO**

Il 55% dei pazienti del gruppo CV (6 cani) e il 62% dei pazienti del gruppo OD (8 cani) ha manifestato questo effetto collaterale.

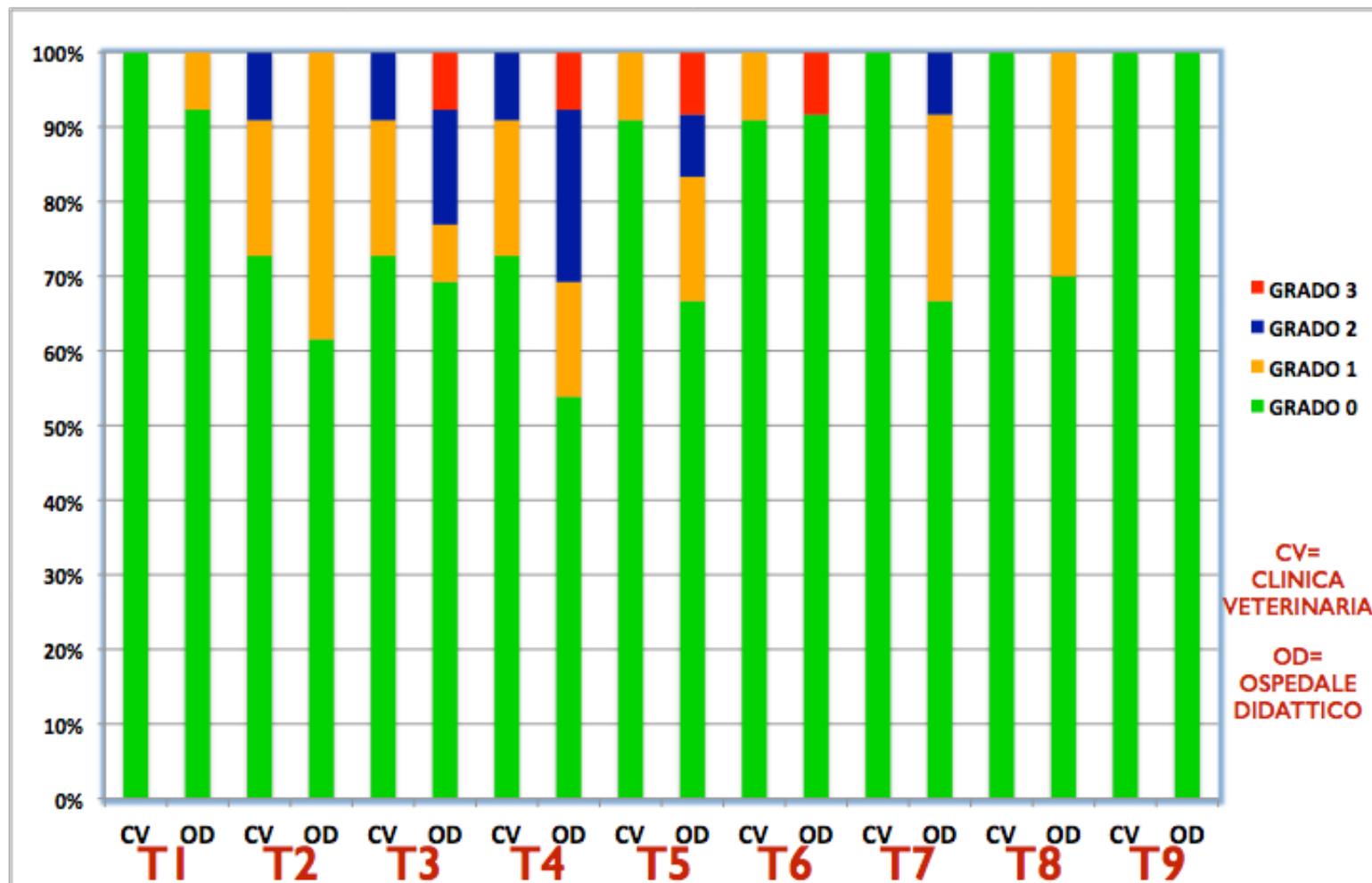


Figura 4.4-1 Confronto fra i pazienti con diversi gradi di perdita di peso

**T1:** nessun paziente del gruppo CV ha perso peso mentre nell'8% dei casi del gruppo OD si può rilevare una perdita di peso di grado 1 (1 solo paziente); non si rileva significatività statistica:  $P=1$  per grado 0 e 1

**T2:** la situazione del gruppo CV è più eterogenea rispetto alla settimana precedente: nel 73% dei pazienti (8 cani) si rileva una perdita di peso di grado 0 mentre nel 18% dei casi (2 cani) c'è stata una perdita di peso di grado 1 e di grado 2 nel 9% (1 cane); nel gruppo OD il 62% manifesta una perdita di peso di grado 0 mentre il 38% di grado 1 (8 e 5 cani, rispettivamente). La significatività statistica non emerge:  $P=0.67$ ,  $0.39$  e  $0.45$  rispettivamente per i gradi 0, 1 e 2.

**T3:** nel 73% dei cani del gruppo CV c'è stata una perdita di peso di grado 0, nel 18% di grado 1 e nel 9% di grado 2 (rispettivamente 8, 2 e 1 cane); nel gruppo OD invece il 69% dei soggetti manifesta una perdita di peso di grado 0 (9 cani), 8% di grado 1 (1 cane), 15% di grado 2 (2 cani) e 8% di grado 3 (1 cane). Non emerge significatività statistica:  $P=1$  per i gradi 0, 2 e 3,  $P=0.57$  per il grado 1.

**T4:** nel 73% dei cani del gruppo CV c'è stata una perdita di peso di grado 0, nel 18% di grado 1 e nel 9% di grado 2 (rispettivamente 8, 2 e 1 cane); nel gruppo OD invece nel 54% dei pazienti si rileva una perdita di peso di grado 0, nel 15% di grado 1, 23% di grado 2 e 8% di grado 3 (rispettivamente 7, 2, 3 e 1 cane). Non si evidenzia significatività statistica:  $P=1$  dal confronto dei gradi 1 e 3,  $P=0.46$  per il grado 0 e  $0.59$  per il grado 2.

**T5:** nel 91% dei cani (10 soggetti) del gruppo CV c'è stata una perdita di peso di grado 0 e nel 9% di grado 1 (1 solo cane); nel 67% dei pazienti del gruppo OD (8 cani) c'è stata una perdita di peso di grado 0, 17% di grado 1 (2 cani), 8% di grado 2 (1 cane) e 8% di grado 3 (1 cane). La

significatività statistica non emerge:  $P=0.3$  per il grado 0,  $P=1$  per i gradi 1, 2 e 3.

**T6:** nel 91% dei cani (10 soggetti) del gruppo CV c'è stata una perdita di peso di grado 0 e nel 9% di grado 1 (1 solo cane); nel gruppo OD abbiamo il 92% dei cani di grado 0 (11 pazienti) e 8% grado 3 (1 paziente). Non si rileva significatività statistica:  $P=1$  per i gradi 0 e 3 e  $P=0.47$  per il grado 1.

**T7:** nel gruppo CV non si rileva perdita di peso mentre nel gruppo OD la situazione è più eterogenea: 67% dei pazienti di grado 0, 25% di grado 1 e 8% di grado 2 (8, 3 e 1 cane, rispettivamente). Non si rileva significatività statistica:  $P=0.09$  per il grado 0, 0.21 per il grado 1 e 1 per il grado 2.

**T8:** nessun paziente del gruppo CV ha perso peso durante questa settimana, del gruppo OD invece il 30% dei cani ha una perdita di peso di grado 1 (3/10 cani). Non si rilevano differenze statisticamente significative:  $P=0.09$  per i gradi 0 e 1.

**T9:** nessun paziente ha perso peso durante questa settimana.

		Neutropenia	Anemia*	Trombocitopenia**	Vomito	Diarrea	Anoressia	Febbre	Perdita di peso
<b>OD</b>	<b>0</b>	71%	55%	94%	93%	96%	90%	96%	73%
	<b>1</b>	16%	32%	5%	3%	4%	7%	3%	16%
	<b>2</b>	6%	10%	0%	4%	0%	1%	1%	7%
	<b>3</b>	3%	2%	0%	0%	0%	2%	0%	4%
	<b>4</b>	4%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	/
	<b>Tot</b>	85% (11/13)	85% (11/13)	31% (4/13)	46% (6/13)	23% (3/13)	46% (6/13)	23% (3/13)	62% (8/13)
<b>CV</b>	<b>0</b>	85%	56%	95%	97%	91%	93%	89%	90%
	<b>1</b>	13%	17%	3%	3%	9%	7%	10%	7%
	<b>2</b>	2%	27%	2%	0%	0%	0%	1%	3%
	<b>3</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	<b>4</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	/
	<b>Tot</b>	55% (7/11)	82% (9/11)	36% (4/11)	27% (3/11)	36% (4/11)	55% (6/11)	36% (4/11)	55% (6/11)

**Tabella 1- % sul totale dei rilievi (101 OD vs 99 CV) e totale di % e n° dei pazienti che hanno manifestato gli effetti collaterali nelle due strutture**

**\* 4/13 pazienti (31%) OD vs 3/11 (27%) CV erano anemici a T0**

**\*\* 3/13 pazienti OD vs 3/11 (27%) CV erano trombocitopenici a T0**

## 5 DISCUSSIONE

Lo scopo di questa tesi è stato quello di comparare la frequenza e la gravità delle reazioni avverse più comuni verificatesi in seguito alla somministrazione di due protocolli chemioterapici diversi per il trattamento del linfoma canino, mettendoli così a confronto per un periodo complessivo di 9 settimane; questo può risultare molto utile nella pratica clinica in quanto può fornire al veterinario un quadro degli effetti avversi che si potrebbe trovare ad affrontare.

Come già detto, per realizzare questa tesi, sono stati selezionati soltanto i casi per i quali è stato possibile raccogliere dati sufficienti circa la comparsa di effetti collaterali post-chemioterapia e per i quali è stato possibile eseguire, da parte del personale dell'Ospedale didattico "M. Modenato" (OD) e della Clinica Veterinaria "Valdinievole" (CV), un follow-up completo di almeno 9 settimane di trattamento; il gruppo di casi oggetto di studio dunque risulta drasticamente ridotto rispetto al totale di casi diagnosticati di linfoma (148 casi), in entrambi i centri oncologici, dal 2007 al 2014. In merito a questo è opportuno segnalare che gli effetti collaterali come vomito, diarrea o anoressia, sono stati riferiti dai proprietari e questo talvolta ha comportato delle difficoltà nella classificazione in base ai criteri VCOG. Un'altra fonte di errore connaturato nella collezione di questi rilievi è stata la variazione nel corso degli anni della tipologie di cartelle cliniche; questa indagine retrospettiva infatti si è spesso tradotta in una difficoltosa lettura soprattutto delle cartelle più vecchie selezionate presso la CV. In questa struttura privata non tutte le cartelle meno recenti erano complete di emogramma e dati anamnestici e per risalire ad essi è stata necessaria la collaborazione del personale della Clinica. In entrambi i centri, invece, le

cartelle cliniche più recenti hanno garantito una raccolta dei dati più agevole e metodica. Un altro limite di questa tesi è stata la mancanza di casi clinici sufficienti e dettagliati: per questa ragione non è stato possibile eseguire il test del chi quadrato per confrontare i dati ottenuti sulla frequenza degli effetti avversi ( $\chi^2$ ).

Non appena è stata confermata la diagnosi di linfoma si è provveduto, in entrambe le strutture, ad effettuare la somministrazione della terapia.

Presso l'OD è stato somministrato il protocollo COP ad alte dosi. Questo schema terapeutico prevede un periodo di induzione di 8 settimane (con somministrazione di vincristina, ciclofosfamide e prednisone) e un successivo periodo di mantenimento con molecole diverse, da intraprendere fino alla recidiva della malattia. A due pazienti refrattari al trattamento è stata somministrata doxorubicina. In un cane, invece, a causa della grave mielosoppressione indotta da vincristina, è stata introdotta L-asparaginasi. La scelta di questo protocollo da parte del personale di questa struttura è legata alla facile reperibilità dei farmaci (ciclofosfamide, vincristina e prednisone) e agli ottimi risultati ottenuti.

Presso la CV è stato utilizzato il protocollo Madison-Wisconsin; questo schema terapeutico ha una durata di 19 o 25 settimane, non prevede mantenimento, e include vincristina, ciclofosfamide, doxorubicina, L-asparaginasi e prednisone. La scelta di questo protocollo è stata dettata, anche in questo caso, dalla facile reperibilità dei farmaci (soprattutto vincristina, ciclofosfamide e doxorubicina), dagli ottimi risultati ottenuti e dall'esperienza maturata negli anni con questo schema terapeutico da parte del personale della struttura. Il punto debole di questo protocollo, che talvolta ha scoraggiato i proprietari nell'intraprendere il percorso completo, è stata la somministrazione prolungata dei farmaci per circa 6 mesi; per 3 pazienti, i cui proprietari non potevano assumersi l'onere di

un percorso così lungo, è stato effettuato un protocollo breve di 9 settimane utilizzando gli stessi farmaci.

Per quanto riguarda gli effetti sull'emogramma, è stata indagata la presenza di neutropenia, anemia e trombocitopenia.

La mielosoppressione è un evento abbastanza comune in questi protocolli: i precursori proliferanti linfoidi e mieloidi sono molto sensibili agli effetti dei chemioterapici tradizionali; i farmaci associati a questa condizione sono vincristina, doxorubicina e agenti alchilanti<sup>15,100,109,119,139</sup>.

In questo studio la neutropenia si è verificata frequentemente con una prevalenza maggiore dei soggetti in cura presso OD: 85% (11/13 pazienti) contro il 55% dei cani in cura presso CV (7/11 pazienti). Dopo aver esaminato la percentuale dei pazienti che ogni settimana hanno sviluppato questo effetto collaterale si può notare che, soprattutto dalla seconda alla quarta settimana di trattamento, i pazienti in cura presso OD hanno manifestato una neutropenia più grave rispetto a quelli in cura presso CV; è importante sottolineare, però, che la percentuale di pazienti di grado 4 durante l'ultima settimana (25%, apparentemente elevata) è legata al fatto che soltanto 4 pazienti dell'OD hanno completato lo studio fino a questo punto (1 solo cane infatti ha sviluppato questo grado di neutropenia a T9).

Per quanto riguarda i pazienti in cura presso OD, 3 cani hanno sviluppato una neutropenia di grado 3 o maggiore e questo effetto collaterale si è verificato, nella maggior parte dei casi, in seguito alla somministrazione di vincristina + ciclofosfamide (un solo paziente a seguito della somministrazione di doxorubicina + ciclofosfamide). Di questi 3 cani, in due è bastato ridurre il dosaggio di vincristina mentre in un caso è stato necessario eliminare questo farmaco dal protocollo (aggiungendo L-asparaginasi); quest'ultimo paziente (un Lupo cecoslovacco di 6 anni) è

stato l'unico dello studio a mostrare una marcata tossicità ematologica e gastroenterica post-vincristina anche dopo la riduzione del dosaggio. Uno studio dimostra che i cani con la mutazione ABCB1-1Δ (vedi cap. 2.3) hanno una maggiore probabilità (75%) di sviluppare effetti collaterali rispetto al gruppo dei sani (26 cani); l'autrice sottolinea, inoltre, che gli stessi soggetti non sviluppano mielosoppressione o tossicità gastroenterica in seguito a somministrazione di ciclofosfamide<sup>88</sup>. Il Lupo cecoslovacco non rientra tra le razze che presentano la mutazione (con maggiore probabilità di presentare un'alterata escrezione biliare o renale della vincristina) ma sarebbe stato interessante eseguire un'analisi del polimorfismo genetico per verificare questa ipotesi<sup>88</sup>. Nessun paziente in cura presso CV ha sviluppato neutropenia di grave entità: 2 cani hanno sviluppato una neutropenia di grado 2 ma entrambi i pazienti erano in buone condizioni cliniche e non c'è stato bisogno di ridurre il dosaggio dei farmaci né di posticipare la somministrazione della terapia. In entrambe le strutture molti pazienti sono stati classificati come neutropenici di grado 1 in quanto i neutrofili risultavano di poco inferiori all'intervallo di riferimento; in merito a questo è importante sottolineare che soltanto 2 cani avevano una lieve neutropenia alla prima visita: questo evento avverso dunque è probabilmente ascrivibile all'effetto mielosoppressivo dei farmaci.

L'anemia è il reperto clinico maggiormente riscontrato; si è verificata in quasi tutti i pazienti, nell'85 % dei cani in cura presso OD e nell'82% di quelli in cura presso CV (rispettivamente in 11/13 e 9/11 soggetti). Questo disordine è presente durante tutte le settimane, con una prevalenza di pazienti di grado 2 in entrambe le strutture; in merito a questo è importante sottolineare che, durante la quarta settimana, emerge una significatività statistica nel confronto fra i pazienti di grado

2: 45% di loro presso CV, nessun paziente presso OD ( $P = 0.010$ ). L'anemia in questi pazienti può conseguire alla patologia di tipo cronico, all'infiltrazione midollare o all'effetto mielosoppressivo dei farmaci; è probabile però che lo stato anemico, data la presenza di 3 cani con infiltrazione midollare così come di pazienti con anemia già presente alla prima visita (4/13 pazienti OD vs 3/11 CV) sia stato aggravato dall'effetto mielosoppressivo dei farmaci.

La percentuale di pazienti anemici è molto elevata ma anche in questo caso molti di loro, nonostante fossero classificati come anemici di grado 1, avevano un ematocrito maggiore di 30% con solo una lieve diminuzione del numero degli eritrociti rispetto all'intervallo di referenza delle due strutture.

La trombocitopenia è uno degli effetti collaterali meno comuni riscontrati a seguito dei trattamenti chemioterapici<sup>139</sup>; anche in questo studio è poco rappresentata, con una prevalenza maggiore durante le prime due settimane e con un picco alla fine del trattamento. Non è facile, anche per questo disordine, risalire a un'eziologia certa: per questa ragione è importante segnalare che un paziente in cura presso OD ha presentato una coagulazione intravasale disseminata alla prima visita (causa della trombocitopenia di grado 3) mentre un altro, affetto da linfoma V stadio con infiltrazione midollare, ha sviluppato una grave trombocitopenia di grado 4 durante l'ultima settimana (in seguito alla somministrazione di doxorubicina + ciclofosfamide); dei pazienti in cura presso CV, invece, un cane ha sviluppato una trombocitopenia di grado 2 durante le prime settimane di trattamento, probabile conseguenza del suo stato clinico (linfoma V stadio con infiltrazione midollare).

In un lavoro di Tomiyasu<sup>139</sup> è stata valutata la comparsa, in 40 cani affetti da linfoma multicentrico, di neutropenia e trombocitopenia a seguito di

un protocollo Madison-Wisconsin di 25 settimane; questi due effetti collaterali sono stati manifestati da 23 pazienti (57.5%), mentre il 12.5% di loro ha sviluppato neutropenia e trombocitopenia di grado 3 o superiore. La percentuale maggiore dei pazienti affetti da questi due segni clinici si era verificata in seguito alla somministrazione di vincristina alla sesta settimana di trattamento (33.3%). La situazione post somministrazione di ciclofosfamide è stata più o meno analoga: 25.6% e 15.6% dei pazienti sviluppano trombocitopenia e neutropenia rispettivamente la seconda e la settima settimana post ciclofosfamide. In questo lavoro gli effetti collaterali di natura ematologica post somministrazione di doxorubicina sono meno rappresentati (13% dei pazienti dopo la prima somministrazione di questo farmaco).

Le percentuali maggiori di pazienti colpiti, dunque, si sono manifestate durante le prime settimane di trattamento in seguito alla somministrazione di vincristina e ciclofosfamide. Per quanto riguarda il gruppo dei pazienti in cura presso la CV, l'82% ha sviluppato questo tipo di effetti collaterali (9/11) ma nessuno, durante le prime 9 settimane, ha avuto neutropenia/trombocitopenia di grado 3 o superiore; analogamente a quanto rilevato da Tomiyasu<sup>139</sup>, la maggior parte degli effetti collaterali di questo tipo si è verificata in seguito alla somministrazione di vincristina (7/11 pazienti, 64% di loro) mentre soltanto 4 pazienti hanno avuto lievi reazioni avverse post doxorubicina e ciclofosfamide (2 pazienti a testa). La trombocitopenia si è verificata in 3 pazienti, post somministrazione di vincristina, ciclofosfamide e doxorubicina. Per quanto riguarda pazienti in cura presso OD, invece, 4/13 (31%) hanno sviluppato trombocitopenia/neutropenia di grado 3 o superiore.

I farmaci utilizzati nelle due strutture sono stati somministrati allo stesso dosaggio: la differenza tra frequenza e gravità di questo effetto collaterale, evidenziata presso i due centri, potrebbe essere spiegata dal maggiore effetto mielosoppressivo dell'associazione vincristina-ciclofosfamide rispetto al singolo principio attivo previsto ogni settimana dal protocollo Madison-Wisconsin; da quanto si evince dal lavoro appena citato, infatti, i maggiori effetti collaterali di natura ematologica, si hanno in seguito alla somministrazione di questi due principi attivi.

Dal punto di vista clinico è stata posta particolare attenzione alla raccolta delle informazioni anamnestiche, riferite dai proprietari, riguardanti la comparsa di effetti collaterali di natura gastroenterica nell'intervallo intercorso tra un controllo e l'altro. Nessuno dei pazienti ha riportato un'anamnesi di anoressia, vomito o diarrea e, come testimoniano alcuni lavori<sup>82,139</sup>, è probabile che questi effetti collaterali dipendano dalla somministrazione dei farmaci piuttosto che dalla malattia stessa; l'anoressia/disoressia è stato quello maggiormente rappresentato in ambedue le sedi (55% dei cani in cura presso CV e 46% di quelli in cura presso OD), il vomito è più frequente nei pazienti dell'OD (46% vs 27% CV) mentre la diarrea si è sviluppata maggiormente nei pazienti della CV (36% vs 23%).

Due cani in cura presso OD, durante le prime settimane di trattamento (a T2 e T3), hanno manifestato una grave anoressia/disoressia; in un soggetto era associata a perdita di peso e disidratazione (7%): per questo cane è stato necessario il ricovero presso il reparto di terapia intensiva dell'OD ma dopo qualche giorno di terapia si è ristabilito e ha terminato il protocollo di induzione. L'altro paziente, invece, ha avuto più di tre giorni di digiuno (con relativa perdita di peso) ma dopo un'adeguata terapia fluida si è ristabilito e ha concluso anche lui il protocollo. Gli altri

pazienti, invece, hanno manifestato soltanto una lieve anoressia di grado 1 che si è sempre risolta facilmente con un semplice cambio di alimentazione. La chemioterapia contribuisce alla malnutrizione attraverso molteplici meccanismi quali anoressia, nausea e vomito e non è sempre facile stabilire se l'anoressia sia conseguenza del trattamento oppure della progressione del tumore.

Nausea e vomito sono effetti collaterali abbastanza comuni e insorgono più frequentemente in seguito alla somministrazione di doxorubicina, vincristina e ciclofosfamide, alcuni dei farmaci utilizzati in questo studio<sup>29,89,139</sup>.

Il meccanismo dell'emesi è regolato dal centro del vomito il quale riceve stimoli chimici da sostanze provenienti dal circolo ematico (i chemioterapici stessi)<sup>72</sup>. Il maropitant è un farmaco dall'efficacia dimostrata nella prevenzione dell'emesi post-chemioterapia<sup>115</sup>: la strategia migliore è quella di prevenire nausea e vomito e, a questo scopo, i veterinari di entrambe le strutture si sono serviti di questo principio attivo.

La diarrea consegue all'effetto lesivo dei chemioterapici sulle cellule in attiva moltiplicazione dell'epitelio intestinale<sup>72</sup>; rispetto agli altri effetti collaterali di natura gastroenterica rilevati, questo non ha mai influito sulla qualità della vita dei pazienti e spesso alcuni cani sono stati classificati di grado 1 pur avendo soltanto feci molli (nessun aumento della frequenza/volume della defecazione), come impone la classificazione VCOG. Un cane in cura presso CV presentava linfoma V stadio con coinvolgimento intestinale quindi gli episodi di diarrea potrebbero dipendere dalla sua situazione clinica piuttosto che dall'effetto dei chemioterapici.

Due lavori hanno valutato la comparsa di vomito, diarrea e anoressia post chemioterapia in cani affetti da linfoma<sup>82,139</sup>; nello studio di Tomiyasu<sup>139</sup>, in seguito alla somministrazione di vincristina, il 50% dei cani ha manifestato effetti avversi di questa natura mentre il 17.5% ha avuto effetti collaterali di grado 3 o superiore. La percentuale di effetti collaterali post ciclofosfamide è assai ridotta (10% dopo la prima e 3% dopo la seconda somministrazione, 1 solo caso di vomito grado 3) mentre solo 1 cane ha avuto un episodio di vomito post doxorubicina. Nel lavoro di Mason<sup>82</sup>, invece, cani affetti da linfoma sono stati suddivisi in due gruppi: a 58 pazienti è stata somministrata vincristina+maropitant (vcr-mp), mentre a 42 è stata somministrata ciclofosfamide + maropitant (clf-mp); il 43% dei cani ha manifestato anoressia, il 34% diarrea e il 24% vomito, mentre nel gruppo clf-mp il 36%, 36% e 21% di cani ha manifestato anoressia, diarrea e vomito, rispettivamente.

Nel gruppo CV il 64% dei pazienti (7/11) ha manifestato effetti collaterali gastroenterici e nella maggior parte dei casi, post somministrazione di vincristina (71%, 5/7 soggetti), 2 cani post somministrazione di ciclofosfamide e 2 post somministrazione di doxorubicina (29%, un cane ha manifestato effetti collaterali post somministrazione di tutti e tre i principi attivi, 3 volte post vincristina e una volta post doxorubicina e ciclofosfamide). Nel gruppo OD invece 9/13 (69%) hanno manifestato questi effetti avversi, tutti post somministrazione di vincristina e ciclofosfamide (in un caso vomito post asparaginasi e anoressia grado 1 post asparaginasi e doxorubicina).

Alla luce dei dati appena analizzati relativi alle due strutture e analogamente a quanto rilevato dai due lavori sopra citati, la vincristina è il farmaco che sembra indurre maggiormente questo tipo di effetti collaterali. Nello studio di Mason<sup>82</sup>, inoltre, il Maropitant non è servito

per ridurre la frequenza e la gravità dell'emesi post-chemioterapia mentre nel lavoro di Tomiyasu<sup>139</sup> (dove non è stato somministrato questo principio attivo) molti pazienti sviluppano effetti collaterali di natura gastroenterica di grado 2 e 3; per quanto riguarda i pazienti in cura presso le due strutture, nessuno ha sviluppato vomito di tipo 3 o superiore e la diarrea non ha mai influito sulla qualità della vita dei soggetti. E' possibile, dunque, contrariamente da quanto emerge dal lavoro di Mason<sup>82</sup>, che il Maropitant sia servito in questi pazienti per ridurre la frequenza e la gravità del vomito post-chemioterapia.

La febbre e la perdita di peso sono stati due riscontri clinici facilmente rilevabili durante le visite cliniche settimanali. Per quanto riguarda i pazienti febbrili, nessuno di loro era neutropenico; la neutropenia chemioterapia-indotta, infatti, rappresenta un pericolo in quanto pone il paziente a rischio infezioni e per scongiurare questa eventualità, quando si è verificata una neutropenia di grado 2 o superiore, il personale dell'OD ha prescritto amoxicillina-acido clavulanico (soluzione praticata da molti veterinari)<sup>119</sup>. Per quanto riguarda i pazienti in cura presso CV, come già spiegato in precedenza, non è stata necessaria la somministrazione di antibiotici in quanto non si è mai verificata una grave neutropenia durante le 9 settimane iniziali; per questi motivi la febbre non è stato un effetto collaterale frequente in questo studio. Un paziente in cura presso OD e uno in cura presso CV hanno sviluppato febbre di grado 2 (40.7° e 40.5°, rispettivamente) post-somministrazione di doxorubicina mentre a un cane in cura presso CV è stata sempre rilevata, durante le 9 settimane, una temperatura media di 39.6° (quindi probabilmente non legata all'effetto dei farmaci).

La perdita di peso si è manifestata in percentuale simile nei due gruppi di studio (55% dei pazienti del gruppo CV e il 62% dei pazienti del gruppo

OD): nella maggior parte dei pazienti il dimagrimento si è sviluppato durante le prime 5 settimane di terapia per poi risolversi gradualmente dalla sesta alla nona settimana di trattamento. Un solo paziente in cura presso OD ha manifestato una grave perdita di peso di grado 3 (> del 15% del valore basale a T0) durante tutto il trattamento. Questo effetto collaterale potrebbe essere associato sia all'anoressia e alla nausea post-chemioterapia (anche se per prevenirla è stato usato il Maropitant) sia alla progressione della malattia stessa.

## **6 CONCLUSIONI**

Da questa indagine retrospettiva emergono alcuni riscontri molto interessanti: la vincristina è il farmaco che sembra avere causato maggiori effetti collaterali di natura gastroenterica ed ematologica; in merito a questo è possibile che la combinazione di vincristina e ciclofosfamide abbia influito maggiormente sulla neutropenia, più grave e più frequente nei pazienti in cura presso l'Ospedale Didattico. Questo effetto collaterale, però, così come gli altri oggetto di studio, non ha mai comportato un peggioramento della qualità di vita dei pazienti in entrambe le sedi. Con questa tesi si è cercato di comparare la frequenza e la gravità di due protocolli molto utilizzati nella terapia del linfoma canino: dai risultati ottenuti, seppur su una casistica ridotta, non emergono differenze statisticamente significative fra le due sedi. I farmaci utilizzati nella terapia del linfoma canino, diversamente da quanto accade nell'uomo, sono ben tollerati e la chemioterapia rappresenta un'opzione valida per prolungare la vita dell'animale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abbo AH, Lucroy MD. "Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006)." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231 (12), 2007: 1836–1842.
2. Alexandrakis I, Tuli R, Ractliffe SC, Tappin SW, Foale RD, Roos A, Slater KJ. 2014. "Utility of a Multiple Serum Biomarker Test to Monitor Remission Status and Relapse in Dogs with Lymphoma Undergoing Treatment with Chemotherapy." *Veterinary and Comparative Oncology*, 2014: 1–12. doi:10.1111/vco.12123.
3. Alvarez FJ, Kisseberth WC, Gallant SL, Couto CG. "Dexamethasone, Melphalan, Actinomycin D, Cytosine Arabinoside (DMAC) Protocol for Dogs with Relapsed Lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (5), 2006: 1178–1183.
4. Aresu L, Martini V, Rossi F, Vignoli M, Sampaolo M, Aricò A, Laganga P, Pierini A, Frayssinet P, Mantovani R, Marconato L. "Canine Indolent and Aggressive Lymphoma: Clinical Spectrum with Histologic Correlation." *Veterinary and Comparative Oncology*, 2013 Jun 20. doi: 10.1111/vco.12048.
5. Baars C, Leeb T, Von Klopmann T, Tipold A, Potschka H. "Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Diagnostic Test for the Functional MDR1 Polymorphism in Dogs." *Veterinary Journal*, (3), 2008: 394–397.
6. Back AR, Schleis SE, Smrkovski OA, Lee J, Smith AN, Phillips JC. "Mechlorethamine, Vincristine, Melphalan and Prednisone (MOMP) for the Treatment of Relapsed Lymphoma in Dogs." *Veterinary and Comparative Oncology*, 2013: doi:10.1111/vco.12055.
7. Baldwin JR, Barbara AP, Overmyer SK, Hatfield NZ, Narang PK. "Influence of the Cardioprotective Agent Dexrazoxane on Doxorubicin Pharmacokinetics in the Dog." *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 30, 1992: 433–438.
8. Baskin CR, Couto CG, Wittum TE. "Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study." *Journal of the American Animal Hospital Association*, 36 (5), 2000: 404–409.
9. Beaver LM, Strottner G, Klein MK. "Response Rate after Administration of a Single Dose of Doxorubicin in Dogs with B-Cell or T-Cell Lymphoma: 41 Cases (2006–2008)." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 237 (9), 2010: 2008–2011.

10. Bertone ER, Snyder LA, Moore AS. "Environmental Tobacco Smoke and Risk of Malignant Lymphoma in Pet Cats." *American Journal of Epidemiology*, 156 (3), 2002: 268-273.
11. Best MP, Fry DR. "Incidence of sterile hemorrhagic cystitis in dogs receiving cyclophosphamide orally for three days without concurrent furosemide as part of a chemotherapeutic treatment for lymphoma: 57 Cases (2007-2012)" *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243, 2013: 1025-1029.
12. Blackwood L, Sullivan M, Lawson H. "Radiographic abnormalities in canine multicentric lymphoma: a review of 84 cases." *The Journal of Small Animal Practice*, 38 (2), 1997: 62-69.
13. Blackwood L, German AJ, Stell AJ, O'Neill T. "Multicentric Lymphoma in a Dog after Cyclosporine Therapy." *The Journal of small animal practice*, 45 (5), 2004: 259-262.
14. Bottero E., "Linfoma alimentare epiteliotropo nel cane" in <<Gastroenterologia del cane e del gatto>> I ED., Poletto editore, Vermezzo (Mi), 2013: 290-296.
15. Britton BM, Kelleher ME, Gregor TP, Sorenmo KU. "Evaluation of Factors Associated with Prolonged Hospital Stay and Outcome of Febrile Neutropenic Patients Receiving Chemotherapy: 70 Cases (1997-2010)." *Veterinary and Comparative Oncology*, 2012: doi: 10.1111/vco.12001
16. Brodsky EM, Maudlin GN, Lachowicz JL, Post GS. "Asparaginase and MOPP Treatment of Dogs with Lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23 (3) 2009: 578-584.
17. Buchholz J, Marconato L. "Terapie Oncologiche Complementari" in <<Oncologia Medica Veterinaria E Comparata>> Poletto Editore, Vermezzo (Mi), 2012: 224-238.
18. Busoni V. "Milza" in <<Ecografia Addominale Del Cane e Del Gatto>> I ED., Poletto Editore, Milano, 2003: 38-43.
19. Carter RF, Valli VE, Lumsden JH. "The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation". *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50 (2), 1986: 154-164.
20. Charney SC, Bergman PJ, Hohenhaus AE, McKnight JA. "Risk factors for sterile hemorrhagic cystitis in dogs with lymphoma receiving cyclophosphamide with or without concurrent administration of furosemide: 216 Cases (1990-1996)." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222 (10), 2003: 1388-1393.

21. Chretin JD, Rassnick KM, Shaw NA, Hahn KA, Ogilvie GK, Kristal O., Northrup NC, Moore AS. "Prophylactic Trimethoprim-Sulfadiazine during Chemotherapy in Dogs with Lymphoma and Osteosarcoma: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (1), 2007: 141-148.
22. Chun R. "Lymphoma: Which Chemotherapy Protocol and Why?" *Topics in Companion Animal Medicine*, 24 (3), 2009: 157-162.
23. Clifford CA, De Lorimer LP, Fan TM, Garret LD. "Neoplastic and non-neoplastic tumors" in <<Small animal dermatology>> Muller & Kirk's, VII ED., Elsevier, St.Louis (Missouri) 2013: 774-883.
24. Cogliatti SB, Schmid U. "Who is WHO and what was REAL?" *Swiss Medical Weekly*, 132 (43-44), 2002: 607-617.
25. Cook AK, Wright ZM, Suchodolski JS, Brown MR. "Prevalence and prognostic impact of hypcobalaminemia in dogs with lymphoma". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235, 2009: 1437-1441.
26. Cough A. "Physical signs" in <<Small animal medical diagnosis>> Blackwell Publishing, Oxford, 2007: 106-116.
27. Couto CG, Rutgers CH, Scherding RG, Rojko J. "Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs: a retrospective study". *Journal of veterinary internal medicine*, 3 (2) 1989: 73-78
28. Couto CG. "Lymphoma" in <<Small Animal Internal Medicine>> Nelson RW e Couto CG, V ED., St. Louis, Missouri, 2014: 1160-1175.
29. Couto CG. "Complications of Cancer Chemotherapy" in <<Small Animal Internal Medicine>> Nelson RW e Couto CG, V Ed., Elsevier, St. Louis, Missouri, 2014: 1144-1154.
30. Coyle KA, Steinberg H. "Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma." *Veterinary Pathology*, 41 (2), 2004: 141-146
31. Dhaliwal RS, Reed AL, Kitchell BE. "Multicentric lymphosarcoma in a dog with multiple-site skeletal involvement." *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 42 (1), 2001: 38-41.
32. Dobson J. "Reducing the side effects of cyclophosphamide chemotherapy in dogs", Editorial, *Veterinary Record*, 2014: 248-250
33. Ettinger SN. "Principles of treatment for canine lymphoma." *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18 (2), 2003: 92-97.
34. Fahey CE, Milner RJ, Barabas K, Lurie D, Kow K, Parfitt S, Lyles S, Clemente M. "Evaluation of the University of Florida Lomustine, Vincristine, Procarbazine, and Prednisone Chemotherapy Protocol for the Treatment of Relapsed Lymphoma in Dogs: 33 Cases (2003-2009)." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 239 (2), 2011: 209-215.

35. FitzPatrick WM, Dervisis NG, Kitchell BE. "Safety of Concurrent Administration of Dexrazoxane and Doxorubicin in the Canine Cancer Patient." *Veterinary and Comparative Oncology*, 8 (4), 2010: 273–282, DOI: 10.1111/j.1476-5829.2010.00225.x
36. Flood-Knapik KE, Durham AC, Gregor TP, Sánchez MD, Durney ME, Sorenmo KU. "Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma". *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(4), 2013: 272–286, doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00317.x
37. Flory AB, Rassnick KM, Erb HN, Garrett LD, Northrup NC, Selting KA, Phillips BS, Locke JE, Chretien JD. "Evaluation of factors associated with second remission in dogs with lymphoma undergoing retreatment with a cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy protocol: 95 cases (2000–2007)" *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238 (4), 2011: 501–506.
38. Frank JD, Reimer SB, Kass PH, Kiupel M. "Clinical outcomes of 30 cases (1997-2004) of Canine Gastrointestinal Lymphoma." *Journal of the American Animal Hospital Association*, 43 (6) 2007: 313–321
39. Fontaine J, Bovens C, Bettenay S, Mueller RS. "Canine Cutaneous Epitheliotropic T-Cell Lymphoma: A Review." *Veterinary and Comparative Oncology*, 7 (1), 2009: 1–14. doi:10.1111/j.1476-5829.2008.00176.x.
40. Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, Marchal T, Chabanne L, Delverdier A, Bryon PA, Felman P. "Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with Human Non-Hodgkin's lymphomas" *Journal of comparative pathology*, 117, 1997: 35–59.
41. Furlanello T, Masserdotti C. "Linfoma" in <<Oncologia del Cane e del gatto>> di Giorgio Romanelli, I ED., Elsevier Masson, Milano, 2007: 262-271.
42. Gaeta R, Brown D, Cohen R, Sorenmo K. "Risk factors for development of sterile haemorrhagic cystitis in canine lymphoma patients receiving oral cyclophosphamide: a case-control study." *Veterinary and Comparative Oncology*, 2012: 1–10
43. Garrett LD, Thamm DH, Chun R, Dudley R, Vail DM. "Evaluation of a 6-Month Chemotherapy Protocol with No Maintenance Therapy for Dogs with Lymphoma" *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, 2002: 704–709.
44. Gavazza A, Presciuttini S, Barale R, Lubas G, Gugliucci B. "Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners". *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15 (3), 2001: 190-195.

45. Gavazza A, Sacchini F, Lubas G, Gugliucci B, Valori E. "Clinical, laboratory, diagnostic and prognostic aspects of canine lymphoma: a retrospective study". *Comparative Clinical Pathology*, 18 (3), 2009: 291–299.
46. Gavazza A, Lubas G, Fridman A, Peruzzi D, Joseph A, Luberto L, Marra E, Roscilli G, Ciliberto G. "Safety and Efficacy of a Genetic Vaccine Targeting Telomerase plus Chemotherapy for the Therapy of Canine B-Cell Lymphoma", 2013: 1–44.
47. Gillings S, Johnson J, Fulmer A, Hauck M. "Effect of a 1-Hour IV Infusion of Doxorubicin on the Development of Cardiotoxicity in Dogs as Evaluated by Electrocardiography and Echocardiography." *Veterinary Therapeutics : Research in Applied Veterinary Medicine*, 10 (1-2), 2009: 46–58.
48. Goldie JH, Coldman AJ. "A Mathematic Model for Relating the Drug Sensitivity of Tumors to Their Spontaneous Mutation Rate." *Cancer Treatment Reports*, 63 (11-12), 1979: 1727–1733.
49. Gramer I, Kessler M, Geyer J. "Determination of MDR1 Gene Expression for Prediction of Chemotherapy Tolerance and Treatment Outcome in Dogs with Lymphoma." *Veterinary and Comparative oncology*, 2013: 1–10, doi: 10.1111/vco.12051.
50. Greenlee PG, Filippa DA, Quimby FW, Patnaik AK, Calvano SE, Matus RE, Kimmel M, Hurvitz AI, Lieberman PH. "Lymphomas in dogs A morphologic, Immunologic and clinical Study." 1990: 480–490.
51. Gustafson DL, Page RL. "Cancer Chemotherapy" in <<Small Animal Oncology>> Withrow & MacEwen's, V ED., Elsevier, St. Louis, Missouri, 2013: 157-179.
52. Hahn KA, Richardson RC, Hahn EA, Chrisman CL. "Diagnostic and Prognostic Importance of Chromosomal Aberrations Identified in 61 Dogs with Lymphosarcoma." *Veterinary Pathology*, 31(5), 1994: 528–540.
53. Hahn KA, Barnhill MA, Freeman KP, Shoieb AM. "Detection and clinical significance of plasma glutathione-S-transferases in dogs with lymphoma." *In Vivo*, 13 (2), 1999: 173–175.
54. Higginbotham ML, McCaw DL, Roush JK, Nietfeld JC, Wilkerson MJ, Reeds K., Burr D. "Intermittent Single-Agent Doxorubicin for the Treatment of Canine B-Cell Lymphoma." *Journal of the American Animal Hospital Association*, 49 (6), 2013: 357–362
55. Hosoya K, Kisseberth WC, Lord LK, Alvarez FJ, Garcia AL, Kosarek CE, London CA, Couto CG. "Comparison of COAP and UW-19 Protocols for Dogs with Multicentric Lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (6), 2007: 1355–1563.

56. Howard E, Robert MH, Cantor KP, Jessen R, Mccurnin DM, Richardson RC. "Case-Control Study of Canine Malignant Lymphoma: Positive Association With Dog Owner's Use of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicides." *National Cancer Institute*, 1991: 1226–1231.
57. Jagielski D, Lechowski R, Hoffmann-Jagielska M, Winiarczyk S. "A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000)." *Journal of veterinary medicine*, 49 (8), 2002: 419–424.
58. Jeffreys AB, Knapp DW, Carlton WW, Thomas RM, Bonney PL, deGortari A, Lucroy MD. "Influence of Asparaginase on a Combination Chemotherapy Protocol for Canine Multicentric Lymphoma." *Journal of the American Animal Hospital Association*, 41 (4), 2005: 221–226.
59. Jeglum KA, Young KM, Barnsley K, Whereat BA "Chemotherapy With Intralymphatic Tumor Cell Vaccine in Canine Lymphoma." *Cancer* 61, 1988: 2042–2050.
60. Kaldrymidou E, Papaioannou N, Poutahidis TH, Karayannopoulou M, Gruys E., Toliou TH, Tsangaris TH. "Malignant lymphoma in nasal cavity and paranasal sinuses of a dog." *Journal of Veterinary Medicine*, 47 (8), 2000: 457–462.
61. Keller ET. "Immune-Mediated Disease as a Risk Factor for Canine Lymphoma." *Cancer*, 70 (9), 1992: 2334–2337.
62. Keller E, MacEwen E, Rosenthal R, Helfand S, Fox L.. "Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7 (5), 1993: 289-295.
63. Kiupel M, Bostock D, Bergmann V. "The prognostic significance of AgNOR counts and PCNA-Positive cell counts in canine malignant lymphomas." *Journal of Comparative Pathology*, 119 (4), 1998: 407–418.
64. Laberke S, Zenker I, Hirschberger J. "Mesna and Furosemide for prevention of cyclophosphamide-induced sterile haemorrhagic cystitis in dogs--a retrospective study." *The Veterinary Record*, 174 (10), 2014: 250
65. Lind DL, Fidel JL, Gay JM, Mealey KL. "Evaluation of Vincristine-associated Myelosuppression in Border Collies" *American Journal of Veterinary Research*, 74, 2013: 257–261
66. Lubas G. "Linfoma del cane" in <<Appunti di ematologia clinica veterinaria>> Edizioni Campano, Pisa, 2011: 174-184.
67. Madewell BR. "Hematological and bone marrow cytological abnormalities in 75 dogs with malignant lymphoma." *Journal of the American Animal Hospital Association*, 22, 1986: 225.

68. MacEwen E, Hayes AA, Matus RE, Kurzman I. "Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981)." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190 (5), 1987: 564-568.
69. Macdonald VS, Thamm DH, Kurzman ID, Turek MM, Vail DM. "Does L-Asparaginase Influence Efficacy or Toxicity When Added to a Standard CHOP Protocol for Dogs with Lymphoma?" *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19, 2005: 732-736.
70. Maiolino P, DeVico G. "Primary Epitheliotropic T-Cell Lymphoma of the Urinary Bladder in a Dog." *Veterinary Pathology*, 37 (2), 2000: 184-186
71. Marconato L, Bonfanti U, Stefanello D, Lorenzo MR, Romanelli G, Comazzi S, Zini E. "Cytosine Arabinoside in Addition to VCAA-Based Protocols for the Treatment of Canine Lymphoma with Bone Marrow Involvement: Does It Make the Difference?" *Veterinary and Comparative Oncology*, 6 (2), 2008: 80-89.
72. Marconato L. <<Principi Di Chemioterapia in Oncologia>> I ED., Poletto Editore, Vermezzo (Mi), 2009.
73. Marconato L, Crispino G, Finotello R, Mazzotti S, Zini E. "Clinical relevance of serial determinations of lactate dehydrogenase activity used to predict recurrence in dogs with lymphoma." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236 (9), 2010: 969-974
74. Marconato L, Stefanello D, Valenti P, Bonfanti U, Comazzi S, Roccabianca P, Caniatti M, Romanelli R, Massari F, Zini E. "Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma" *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238 (4), 2011: 480-485
75. Marconato L, Rossi F, Bettini G, Comazzi S, Bonfanti U, Buchholz J. "Linfoma" in <<Oncologia medica veterinaria e comparata>> III ED., Poletto editore, Vermezzo (Mi) 2012: 759-817.
76. Marconato L. "Principi di chemioterapia" in <<Oncologia Medica Veterinaria e Comparata>> III ED., Poletto Editore, Vermezzo (Mi), 2012: 153-165.
77. Marconato L. "Tossicità da chemioterapia e gestione" in <<Oncologia Medica Veterinaria e Comparata>> III ED., Poletto Editore, Vermezzo (Mi), 2012: 179-201.
78. Marconato L. "Chemioterapici in Medicina Veterinaria" in <<Oncologia Medica Veterinaria e Comparata>> III ED., Poletto Editore, Vermezzo (Mi), 2012: 166-178.
79. Marconato L. <<Cosa c'è di nuovo per il linfoma del cane?>> atti 79° congresso nazionale SCIVAC, Palermo, 2013.

80. Marconato L, Frayssinet P, Rouquet N, Comazzi S, Leone VF, Laganga P, Rossi F, Vignoli M, Pezzoli L, Aresu L. "Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blinded Chemoimmunotherapy Clinical Trial in a Pet Dog Model of Diffuse Large B-Cell Lymphoma." *Clinical Cancer Research*, 20 (3), 2013: 668–677.
81. Marrington AM, Killick DR, Grant IA, Blackwood L. "Toxicity Associated with Epirubicin Treatments in a Large Case Series of Dogs." *Veterinary and Comparative Oncology*, 10 (2), 2012: 113–123.
82. Mason SL, Grant IA, Elliott J, Cripps P, Blackwood L. "Gastrointestinal toxicity after vincristine or cyclophosphamide administered with or without maropitant in dogs : a prospective randomised controlled study." *Journal of Small Animal Practice*, 2014: 1–8.
83. Mauldin GE, Fox PR, Patnaik AK, Bond BR, Mooney SC, Matus RE. "Doxorubicin-Induced Cardiotoxicosis. Clinical Features in 32 Dogs." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 6 (2), 1992: 82–88
84. McDonough SP, Van Winkle TJ, Valentine B, VanGessel Y, Summers B. "Clinicopathological and immunophenotypical features of canine intravascular lymphoma (malignant angioendotheliomatosis)". *Journal of Comparative Pathology*, 126 (4), 2002: 277–288.
85. Mealey KL, Bentjen SA, Waiting DK. "Frequency of the Mutant MDR1 Allele Associated with Ivermectin Sensitivity in a Sample Population of Collies from the Northwestern United States." *American Journal of Veterinary Research*, 63 (4), 2002: 479–481
86. Mealey KL, Northrup NC, Bentjen SA. "Increased Toxicity of P-Glycoprotein-Substrate Chemotherapeutic Agents in a Dog with the MDR1 Deletion Mutation Associated with Ivermectin Sensitivity" *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223 (10), 2003: 1453-1455.
87. Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Hosick HL. "Dexamethasone treatment of a canine, but not human, tumour cell line increases chemoresistance independent of P-Glycoprotein and multidrug resistance-related protein expression." *Veterinary and Comparative Oncology*, 1 (2), 2003: 67–75.
88. Mealey KL, Fidel JL, Gay JM, Impellizeri JA, Clifford CA, Bergman PJ. "ABCB1-1D Polymorphism Can Predict Hematologic Toxicity in Dogs." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 2008: 996–1000.
89. Mellanby RJ, Herrtage ME, Dobson JM. "Treatment of Canine Lymphoma by Veterinarians in First Opinion Practice in England." *The Journal of Small Animal Practice*, 43 (5), 2002: 198–202.

90. Miller AG, Morley PS, Rao S, Avery AC, Lana SE, Olver CS. "Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23 (1), 2009: 116–122.
91. Modiano JF, Breen M, Burnett RC, Parker HG, Inusah S, Thomas R, Avery PR, Lindblad-Toh K, Ostrander EA, Cutter GC, Avery AC. "Distinct B-Cell and T-Cell Lymphoproliferative Disease Prevalence among Dog Breeds Indicates Heritable Risk" *American Associations for Cancer Research*, 65 (13), 2005: 5654–5661.
92. Moore PF, Olivry T, Naydan D. "Canine cutaneous epitheliotropic lymphoma (Mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD8+ T cells." *American Journal of Pathology*, 144 (2), 1994: 421–429.
93. Moore AS, London CA, Wood CA, Williams LE, Cotter SM, L'Heureux DA, Frimberger AE. "Lomustine (CCNU) for the Treatment of Resistant Lymphoma in Dogs." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13 (5), 1999: 395–398.
94. Moore AS, Cotter SM, Rand WM, Wood CA, Williams LE, London CA, Frimberger AE, L'Heureux DA. "Evaluation of a Discontinuous Treatment Protocol (VELCAP-S) for Canine Lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15 (4), 2001: 348–354.
95. Morrison WB. "Non-Cutaneous Lymphoma in the dog and cat" in <<Lymphoma in dogs and cats>> Teton NewMedia, 90 East Simpson, Suite 110 Jackson, 2004: 1-85.
96. Mutsaers AJ, Glickman NW, DeNicola DB, Widmer WR, Bonney PL, Hahn KA, Knapp DW. "Evaluation of Treatment with Doxorubicin and Piroxicam or Doxorubicin Alone for Multicentric Lymphoma in Dogs." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220 (12), 2002: 1813–1817.
97. Mutsaers AJ, Widmer WR, Knapp DW. "Canine transitional cell carcinoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, 2003: 136–144.
98. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer*, 49, 1982: 2112–2135
99. Nielsen L, Toft N, Eckersall DP, Mellor DJ, Morris JS. "Serum C-Reactive protein concentration as an indicator of remission status in dogs with multicentric lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (6), 2007: 1231–1236.
100. Northrup NC, Rassnick KM, Snyder LA, Stone MS, Kristal O, Susan M, Moore AS. "Neutropenia Associated with Vincristine and L-Asparaginase Induction Chemotherapy for Canine Lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, 2002: 570–575.

101. Northrup NC, Gieger TL, Kosarek CE, Saba CF, LeRoy BE, Wall TM, Hume KR, Childress MO, Keys DA. "Mechlorethamine, Procarbazine and Prednisone for the Treatment of Resistant Lymphoma in Dogs." *Veterinary and Comparative Oncology*, 7 (1), 2009: 38–44.  
doi:10.1111/j.1476-5829.2008.00170.x.
102. O'Brien D, Moore PF, Vernau W, Peauroi JR, Rebhun RB, Rodriguez CO Jr, Skorupski KA. "Clinical Characteristics and Outcome in Dogs with Splenic Marginal Zone Lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27 (4), 2013: 949–954.
103. Penzo C, Spugnini EP. "Chemioterapia" in <<Prontuario terapeutico veterinario SCIVAC>>, VI ED., E.V. editore, Cremona, 2014: 629-648
104. Peruzzi D, Mesiti G, Ciliberto G, La N, Aurisicchio L. "Telomerase and HER-2 / Neu as Targets of Genetic Cancer Vaccines in Dogs." *Vaccine*, 28, 2010: 1201–1208.
105. Peruzzi D, Gavazza A, Mesiti G, Lubas G, Scarselli E, Conforti A, Bendtsen C, Ciliberto G, Monica N, Luigi Aurisicchio L. "A Vaccine Targeting Telomerase Enhances Survival of Dogs Affected by B-Cell Lymphoma." *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18 (8), 2010: 1559–1567
106. Phillips BS, Kass PH, Naydan DK, Winthrop MD, Griffey SM, Madewell BR. "Apoptotic and Proliferation Indexes in Canine Lymphoma." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12 (2), 2000: 111–117.
107. Piek CJ, Rutteman GR, Teske E. "Evaluation of the Results of a L-Asparaginase-Based Continuous Chemotherapy Protocol versus a Short Doxorubicin-Based Induction Chemotherapy Protocol in Dogs with Malignant Lymphoma." *The Veterinary Quarterly*, 21 (2), 1999: 44–49.
108. Ponce F, Magnol J-P, Ledieu D, Marchal T, Turinelli V, Chalvet-Monfray K, Fournel-Fleury C. "Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy." *The Veterinary Journal*, 167 (2), 2004: 158–166.
109. Price SG, Page RL, Fischer BM, Levine JF, Gerig TM. "Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma". *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5 (5), 1991: 259–262.
110. Rappaport H. Tumors of the hematopoietic system In <<Atlas of Tumor Pathology>>, Armed Forces Institute of Pathology, 3, 1966: 8-15.
111. Raskin RE, Krehbiel JD. "Prevalence of leukemic blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 194 (10), 1989: 1427–1429.

112. Rassnick KM, Mauldin GE, Al-Sarraf R, Mauldin GN, Moore AS, Mooney SC. "MOPP Chemotherapy for Treatment of Resistant Lymphoma in Dogs: A Retrospective Study of 117 Cases (1989-2000)." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16 (5), 2002: 576–580.
113. Rassnick KM, McEntee MC, Erb HN, Burke BP, Balkman CE, Flory AB, Kiselow MA, Autio K, Gieger TL. "Comparison of 3 Protocols for Treatment after Induction of Remission in Dogs with Lymphoma" *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 2007: 1364–1373.
114. Rassnick KM, Moore AS, Collister KE, Northrup NC, Kristal O, Chretien JD, Bailey DB. "Efficacy of combination chemotherapy for treatment of gastrointestinal lymphoma in dogs." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23 (2), 2009: 317–322.
115. Rau SE, Barber LG, Burgess KE. "Efficacy of Maropitant in the Prevention of Delayed Vomiting Associated with Administration of Doxorubicin to Dogs" *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, 2010: 1452–1457.
116. Rebhun RB, Kent MS, Borroffka SAEB, Frazier S, Skorupski K, Rodriguez CO. "CHOP Chemotherapy for the Treatment of Canine Multicentric T-Cell Lymphoma." *Veterinary and Comparative Oncology*, 9 (1), 2011: 38–44, DOI: 10.1111/j.1476-5829.2010.00230.x
117. Reif JS, Lower KS, Ogilvie GK. "Residential Exposure to Magnetic Fields and Risk of Canine Lymphoma." *American journal of epidemiology*, 141 (4), 1995: 352–359.
118. Re G, Odore R. "Chemioterapici Antitumorali" <<Farmacologia Veterinaria>> di Carli, Ormas, Re, Soldani, I ED., Idelson-Gnocchi, Napoli, 2009.
119. Regan RC, Kaplan MSW, Bailey DB. "Diagnostic Evaluation and Treatment Recommendations for Dogs with Substage-a High-Grade Multicentric Lymphoma: Results of a Survey of Veterinarians." *Veterinary and Comparative Oncology*, 11 (4), 2012: 287–295, doi: 10.1111/j.1476-5829.2012.00318.x.
120. Rosenberg MP, Matus RE, Patnaik AK. "Prognostic factors in dogs with lymphoma and associated hypercalcemia." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5 (5), 1991: 268–271.
121. Ruslander DA, Gebhard DH, Tompkins MB, Grindem CB, Page RL. "Immunophenotypic Characterization of Canine Lymphoproliferative Disorders." *In Vivo*, 11 (2), 1997: 169–172
122. Saba CF, Hafeman SD, Vail DM, Thamm DH. "Combination Chemotherapy with Continuous L-Asparaginase, Lomustine, and Prednisone for Relapsed Canine Lymphoma" *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 2009: 1058–1563.

123. Sato M, Yamzaki J, Goto-koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. "The Prognostic Significance of Minimal Residual Disease in the Early Phases of Chemotherapy in Dogs with High-Grade B-Cell Lymphoma." *The Veterinary Journal*, 195 (3), 2013: 319–324.
124. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. "Glucocorticoid-Induced Apoptosis and Glucocorticoid Resistance: Molecular Mechanisms and Clinical Relevance." *Cell Death and Differentiation*, 11, Suppl 1 (July), 2004: S45–S55.
125. Simon D, Nolte I, Eberle N, Abbrederis N, Killich M, Hirschberger J. "Treatment of Dogs with Lymphoma Using a 12-Week, Maintenance-Free Combination Chemotherapy Protocol." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (4), 2006: 948–954-
126. Simon D, Moreno SN, Hirschberger J, Moritz A, Kohn B, Neumann S, Jurina K, Scharvogel S, Schwedes C, Reinacher M, Beyerbach M, Nolte I. "Efficacy of a Continuous, Multiagent Chemotherapeutic Protocol versus a Short-Term Single-Agent Protocol in Dogs with Lymphoma." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232 (6), 2008: 879–885.
127. Sorenmo KU, Krick E, Coughlin CM, Overley B, Gregor TP, Vonderheide RH, Mason NJ. "CD40-Activated B Cell Cancer Vaccine Improves Second Clinical Remission and Survival in Privately Owned Dogs with Non-Hodgkin's Lymphoma." *PloS One*, 6 (8), 2011: 1-8
128. Spugnini EP. "Use of hyaluronidase for the treatment of extravasation of chemotherapeutic agents in six dogs." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221 (10), 2002: 1437–1440.
129. Starrak GS, Berry CR, Page RL, Johnson JL, Thrall DE. "Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 Dogs with lymphosarcoma." *Veterinary Radiology & Ultrasound: The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 38 (6), 1996: 411–418.
130. Stefanello D, Valenti P, Zini E, Comazzi S, Gelain ME, Roccabianca P, Avallone G, Caniatti M, Marconato L. "Splenic Marginal Zone Lymphoma in 5 Dogs (2001–2008)." *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, 2011: 90–93.
131. Steinberg H, Dubielzig RR, Thomson J, Dzata G. "Primary gastrointestinal lymphosarcoma with epitheliotropism in three Shar-Pei and one Boxer dog." *Veterinary Pathology*, 32 (4), 1995: 423–426.
132. Stockam SL, Scott MA. "Calcium, phosphorus, magnesium, and their regulatory hormones" in <<Fundamentals of veterinary clinical pathology>> II ED., Blackwell Publishing, 221 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA, 2008: 593-638.

133. Story MD, Voehringerl DW, Clifton SL, Meynl RE. "L-Asparaginase Kills Lymphoma Cells by Apoptosis." *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 32, 1993: 129–33.
134. Teske E, Van Heerde P, Rutteman GR, Kurzman ID, Moore PF, MacEwen EG. "Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs" *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205, 1994: 1722–1728.
135. Teske E, Wisman P, Moore PF, VanHeerde P. "Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology." *Experimental Hematology*, 22 (12), 1994: 1179-1187.
136. Teske E. "Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma". *The Veterinary Quarterly*, 16 (4), 1994: 209–219.
137. Thamm DH, Vail DM. "Aftershocks of cancer chemotherapy: managing adverse effects." *Journal of the American Animal Hospital Association*, 43 2007: 1–7.
138. Thomas R, Smith KC, Ostrander EA, Galibert F, Breen M. "Chromosome Aberrations in Canine Multicentric Lymphomas Detected with Comparative Genomic Hybridisation and a Panel of Single Locus Probes." *British Journal of Cancer*, 89 (8), 2003: 1530–1537.
139. Tomiyasu H, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. "Gastrointestinal and Hematologic Adverse Events after Administration of Vincristine, Cyclophosphamide, and Doxorubicin in Dogs with Lymphoma That Underwent a Combination Multidrug Chemotherapy Protocol." *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 72 (11), 2010: 1391–1397.
140. Tomley FM, Armstrong SJ, Mahy BWJ, Owen LN. "Reverse transcriptase activity and particles of retroviral density in cultured canine lymphosarcoma supernatants." *British journal of cancer*, 47(2), 1983: 277–284.
141. Turek MM, Thamm DH, Mitzey A, Kurzman ID, Huelsmeyer MK, Dubielzig RR, Vail DM "Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor DNA Cationic-Lipid Complexed Autologous Tumour Cell Vaccination in the Treatment of Canine B-Cell Multicentric Lymphoma." *Veterinary and Comparative Oncology*, 5 (4), 2007: 219–231. doi:10.1111/j.1476-5829.2007.00128.x.
142. Turinelli V. "Esplorazione del tessuto linfoide nella specie canina. Applicazione allo studio di alcuni sottotipi di Linfomi maligni Non Hodgkin del cane, ancora poco conosciuti, in comparazione con i dati umani." Tesi di dottorato in Medicina Veterinaria, Pisa, 2003

143. Vail DM, Kisseberth WC, Obradovich JE, Moore FM, London CA, MacEwen EG, Ritter MA "Assessment of Potential Doubling Time (Tpot), Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNOR), and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) as Predictors of Therapy Response in Canine Non-Hodgkin's Lymphoma." *Experimental Hematology*, 24, 1996: 807-815
144. Vail DM, Thamm DH. "Tumori dei tessuti emopoietici" in <<Clinica medica veterinaria Malattie del cane e del gatto>> Ettinger SJ, Feldman EC., VI ED., Elsevier Masson, Milano, 2008: 752-761.
145. Vail DM. "Tumours of the haemopoietic system" in <<BSVA manual of canine and feline oncology> III ED., Dobson J, Lascelles D., 2010: 285-303.
146. Vail DM, Michels GM, Khanna C, Selting KA, London CA. "Response Evaluation Criteria for Peripheral Nodal Lymphoma in Dogs (v1.0)--a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) Consensus Document." *Veterinary and Comparative Oncology*, 8 (1), 2010: 28-37.
147. Vail DM, Pinkerton ME, Young KM. "Hematopoietic Tumors" in <<Small Animal Oncology>> Withrow & MacEwen's, V ED., Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2013: 608-678.
148. Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W, Moore PF. "Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals" Washington D.C., Armed Forces Institute of Pathology, 2002.
149. Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP, Graham PS, Moore PF. "Canine indolent nodular lymphoma". *Veterinary Pathology*, 43 (3), 2006: 241-256.
150. Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, Durham A, Ehrhart EJ, Johnson Y, Jones C, Kiupel M, Labelle P, Lester S, Miller M, Moore P, Moroff S, Roccabianca P, Ramos-Vara J, Ross A, Scase T, Tvedten H, Vernau W. "Classification of Canine Malignant Lymphomas according to the World Health Organization Criteria." *Veterinary Pathology*, 48 (1), 2011: 198-211.
151. Valli VE, Kass PH, San Myint M, Scott F. "Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival." *Veterinary Pathology*, 50 (5), 2013: 738-748
152. Valori E. "Analisi Retrospettiva Pluriennale di Casi di Linfoma Maligno Nel Cane. Principali Osservazioni Di Carattere Clinico E Di laboratorio" Tesi Di Laurea in Medicina Veterinaria. Pisa, 2006
153. Van Tellingen O. "The Importance of Drug-Transporting P-Glycoproteins in Toxicology." *Toxicology Letters*, 120 (1-3), 2001: 31-41

154. Veterinary Cooperative Oncology Group "Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) Following Chemotherapy or Biological Antineoplastic Therapy in Dogs and Cats v1.1." *Veterinary and Comparative Oncology*, 5, 2011: 1-30.
155. Vezzali E, Parodi L, Marcato PS, Bettini G. "Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO". *Veterinary and Comparative Oncology*, 8 (1), 2010: 38-49.
156. Vicini DS, Ogilvie GK, Katzenellenbogen J, Carlson K. "Measurement of estrogen receptors in normal and neoplastic lymphnode tissue from dogs". *American Journal of Veterinary Research*, 52(12), 1991: 2055-2059.
157. Villamil JA, Henry CJ, Hahn WA, Bryan JN, Tyler JW, Caldwell CW. "Hormonal and Sex Impact on the Epidemiology of Canine Lymphoma." *Journal of Cancer Epidemiology*, 2009: 1-7, Article ID 591753, doi:10.1155/2009/591753 Research.
158. Withers SS, Kass PH, Rodriguez jr. CO, Skorupsky KA, O'Brien D, Guerrero TA, Sein KD, Rebhun RB. "Fasting Reduces the Incidence of Delayed-Type Vomiting Associated with Doxorubicin Treatment in Dogs with Lymphoma." *Translational Oncology*, 2014: 1-7.
159. Yanti O, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens L. "Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy : From Molecular Mechanisms to Therapeutic Strategies." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52 (6), 2012: 1213-1225.
160. Zhang A, Ohshima K, Sato K, Kanda M, Suzumiya J, Shimazaki K, Kawasaki C, Kikuch M. "Prognostic Clinicopathologic Factors, Including Immunologic Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphomas." *Pathology International*, 49 (12), 1999: 1043-1052.

## RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Lubas e la Dott.ssa Gavazza per tutti gli insegnamenti ricevuti durante i turni (che mi mancheranno tanto), per la pazienza, la cordialità e la professionalità che mi hanno permesso di portare a termine questo lavoro. Un grazie sincero al dott. Giorgi per tutti i preziosi consigli che mi hanno permesso di migliorare e terminare questa tesi.

Ringrazio la mia splendida famiglia: babbo, mamma, Giulia, Cady e Lovi: vi voglio un bene infinito e mi sembra scontato dire che senza di voi la mia vita non sarebbe la stessa. Grazie al mio babbo, la persona che stimo di più al mondo dal punto di vista umano e professionale, spero di diventare anche solo la metà di quello che è diventato lui. Grazie alla mia mamma, una donna splendida che per me farebbe qualsiasi cosa (e io per lei). Grazie alla Giulia e alla Lovi (amiche inseparabili ☺): in quest'ultimo mese sono stato insopportabile e voi mi avete sempre aiutato nei momenti più delicati, spero di poter essere il vostro punto di riferimento come voi lo siete state e lo sarete per me. Voglio ringraziare la mia splendida fidanzata Elena (Lovi ☺): ti amo e spero di potertelo dimostrare sempre, senza di te non sarei mai riuscito a finire questo lavoro e quello che fai per me è incredibile, spero che tra noi duri per sempre. Grazie alla mia sorellina Giulia, una persona fantastica che fa sempre il bene delle persone che le stanno vicino, per la nostra famiglia è un pilastro insostituibile e mi sembra scontato dire che le voglio un bene infinito. Grazie alla Cady (anche se dorme troppo), la mia sorellina acquisita, ti voglio bene anche se ogni tanto sono 1 po' cattivo con te. Grazie al mio mitico zio Luigi e alla zia Antonella, due persone splendide che non si dimenticano mai di me, sono sicuro che nei momenti più

importanti della mia vita ci sarete sempre. Grazie alla mia cugina Francesca e al mio cugino mezzofondista pizzaiolo Luca (lo ringrazio anche se è della Fiorentina), a Filippo, Elisa e ai miei cuginetti adorati Pietro, Filippo, Emma e Diego: una famiglia meravigliosa, vi voglio davvero tanto bene. Grazie alla Zia Lilia e al mio cugino Carlo: anche se ci vediamo poco siete una parte importante della mia famiglia. Grazie a Marina e Marzia: senza di voi non sarei mai riuscito a fare questa tesi.

Grazie a Chiara e al Taolins, i miei migliori amici che mi hanno sempre aiutato nei momenti delicati della mia vita. Grazie a Stefano e Valentina, due amici fantastici, non vedo l'ora di poter imparare da voi quando lavoreremo insieme. Grazie a Giovà, un amico insostituibile e introvabile, una delle persone più buone che conosca. Grazie agli amici dell'università per i bellissimi momenti passati in questi anni: Guido (anche se è di dubbia moralità), Fede, Marruk, Edo, Sandy, Luca, Marika, Michele e Samu, poi grazie in particolare a quel "cialtrone" di Jacopo M. Grazie agli amici del QCB per tutte le trasferte e i momenti passati insieme: grazie a coach Maurizio e coach Berti, Anto, Capitano, Bomber, Stefa, Cava e al mio grande amico Lomba, siete i numeri uno e spero che in un futuro potremmo tornare a giocare insieme (io in panchina e voi in campo). Grazie agli amici di Montecatini con cui fin dai tempi del liceo ho passato dei momenti unici: i miei super amici Steven, Michele (a cui devo un paio di scarpe) e Carlo Alberto, Daniele, Andrea, Lore, Marco, Francesco. Grazie alla vecchia guardia di Massa e Cozzile, Ghila e Carde, anche se ci vediamo poco siete due amici storici e insostituibili. Grazie a France C., Marco P. e Matteo C., gli anni di convivenza nella casa di via Fiorentina sono stati fantastici. Grazie a Giulia e Antonella, due amiche uniche. Grazie ai miei amici Lore M. e Matteo M., vi conosco fin dalla prima elementare e la nostra amicizia durerà per sempre.