

CHEMIOTERAPIA E TERAPIA MOLECOLARE IN ONCOLOGIA VETERINARIA: STATO DELL'ARTE

CHEMOTHERAPY AND MOLECULAR THERAPY IN VETERINARY ONCOLOGY: STATE OF THE ART

LAURA MARCONATO

Clinica Veterinaria L'Arca, Vico Cacciottoli 46/47, 80129 Napoli

Riassunto

La chemioterapia riveste ancora oggi un ruolo di rilievo nel trattamento di molte neoplasie negli animali domestici, sebbene la terapia a bersaglio molecolare stia diventando importante anche in medicina veterinaria. Scopo di questo lavoro è di rivedere i chemioterapici più comunemente utilizzati nella pratica clinica, e di mettere in luce nuove strategie terapeutiche ed il potenziale utilizzo di anticorpi monoclonali e inibitori tirosin-chinasici.

Summary

Chemotherapy still plays a key role in the treatment of many tumors affecting dogs and cats; however, novel anticancer strategies including monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors are becoming relevant in veterinary medicine also. The most commonly used and the recently-introduced chemotherapeutic drugs, as well as new targets for cancer treatment are reviewed.

CHEMIOTERAPIA

La chemioterapia tradizionale riveste oggi ancora un ruolo di rilievo tra le terapie mediche in oncologia e, in molti casi, è in grado di modificare il decorso naturale di alcune neoplasie. Nonostante gli importanti progressi recentemente raggiunti in campo oncologico, è bene ricordare che la chemioterapia tuttora rappresenta un importante presidio medico a disposizione.

La chemioterapia colpisce sia la popolazione cellulare maligna, sia la popolazione normale, con conseguente riduzione della massa tumorale (effetto antitumorale) ma anche del tessuto normale (effetto tossico). In generale, i chemioterapici uccidono la cellula neoplastica danneggiandone il DNA, e quindi impedendo la sua replicazione.

La chemioterapia è il trattamento d'elezione nel caso di neoplasie sistemiche (linfoma e leucemie) o metastatiche (con intento palliativo), ma può essere utilizzata anche in fase adiuvante (dopo chirurgia) per sterilizzare margini chirurgici ed eradicare micrometastasi. L'utilità della chemioterapia neo-adiuvante non è ancora stata sufficientemente documentata, tuttavia può essere utilizzata per ridurre masse neoplastiche voluminose e inoperabili (con l'obiettivo eventuale di intervenire chirurgicamente in un secondo

momento; "down-staging"), oppure per potenziare l'efficacia della radioterapia (effetto radio-sensibilizzante).

I chemioterapici vengono schematicamente suddivisi in 5 classi principali:

1. Agenti alchilanti
2. Antimetaboliti
3. Inibitori delle topoisomerasi
4. Agenti antimicrotubulari
5. Derivati del platino

Agenti alchilanti

Gli agenti alchilanti¹ sono stati i primi farmaci non ormonali introdotti per il trattamento antitumorale sistemico. Comprendono farmaci chimicamente differenti che si legano in modo covalente attraverso gruppi alchilici ($-CH_2Cl$) con macromolecole intracellulari. Generalmente, in seguito al legame covalente, si formano metaboliti intermedi reattivi e carichi positivamente, che a loro volta interagiscono con gruppi nucleofili carichi negativamente (come, ad esempio, le basi di DNA). In base al numero di gruppi reattivi presenti, gli agenti alchilanti sono classificati in monofunzionali o bifunzionali, questi ultimi ritenuti clinicamente più efficaci. Gli agenti alchilanti si legano direttamente al DNA, e sono pertanto classificati come ciclo-cellulare aspecifici. Il principale meccanismo citotossico si esplica attraverso alchilazione delle basi di DNA

¹Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 17/05/2007 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 05/06/2007".

oppure rotture della doppia elica. Tossicità comune indotta da tutti gli agenti alchilanti riguarda midollo osseo (mielosoppressione) e tratto gastroenterico (nausea, vomito, anoressia). In medicina umana l'uso prolungato di nitrosouree, mecloretamina e melphalan è stato associato a cancerogenesi (essenzialmente induzione di leucemia mielogena acuta), mentre l'uso a lungo termine di ciclofosfamide (CTX) può favorire lo sviluppo di tumori urinari. Tali effetti collaterali non sono riportati in medicina veterinaria, probabilmente perché spesso cani e gatti muoiono prima di risentire degli effetti carcinogeni tardivi dei farmaci antitumorali.

Gli agenti alchilanti comunemente utilizzati in medicina veterinaria sono: mecloretamina, clorambucile, melphalan, CTX, lomustina e procarbazine.²

La *mecloretamina* è stata il primo farmaco antitumorale ad essere utilizzato nella clinica. Attualmente le indicazioni in medicina veterinaria si limitano a forme di micosi fungoide³, oppure linfomi refrattari e recidivati in regimi combinati di salvataggio (MOPP: mecloretamina, vincristina, prednisone, procarbazine).⁴ Può essere somministrata per via parenterale (endovenosa; EV) o topica; in quest'ultimo caso è molto importante proteggersi dalla tossicità da contatto.

Il *clorambucile* è un farmaco con buon assorbimento orale ma con stretto spettro di attività antitumorale, utilizzato essenzialmente per il trattamento di tumori lentamente progressivi, come linfomi a basso grado e leucemia linfocitica cronica.²

Il *melphalan* è utilizzato per il trattamento di mieloma multiplo,² adenocarcinomi delle ghiandole apocrine dei sacchi anali^{5,6} e linfomi in regimi di salvataggio (DMAC: desametazone, melphalan, d-actinomicina, citosina arabinoside).⁷ Sia clorambucile sia melphalan sono tossici su cellule in replicazione e non, e possono pertanto provocare tossicità cumulativa midollare dal momento che danneggiano anche le cellule emopoietiche staminali.

CTX è l'agente alchilante dal più ampio utilizzo clinico ed è incorporato in protocolli di polichemioterapia per il trattamento di vari carcinomi e linfomi.² CTX è metabolizzata a livello epatico da enzimi citocromo P-450 dipendenti con formazione di fosforamide, metabolita attivo, e acroleina, responsabile della tossicità uroteliale. In genere CTX non danneggia le cellule emopoietiche staminali; pertanto, la tossicità cumulativa midollare è complicanza rara. Molto più frequente è invece la tossicità gastroenterica.

La *lomustina*² è un agente alchilante monofunzionale liposolubile, completamente assorbito dopo somministrazione orale, efficace per il trattamento di linfomi refrattari,^{8,9} linfoma cutaneo epiteliotropo,¹⁰⁻¹¹ sarcoma istiocitico¹² e mastocitoma.¹³ Dal momento che penetra la barriera emato-encefalica (BEE), può essere somministrata per il trattamento di neoplasie cerebrali.¹⁴ Contrariamente agli altri agenti alchilanti, la lomustina penetra nelle cellule per diffusione passiva. Ne deriva che non risente della resistenza mediata dal trasporto, inoltre non è substrato della glicoproteina-P, responsabile di farmaco-resistenza multipla (MDR). La lomustina è metabolizzata dagli enzimi citocromo P450-dipendenti; pertanto, una marcata attività microsomiale (osservata, ad esempio, durante terapie concomitanti con barbiturici) ne riduce l'efficacia antitumora-

le.¹⁴ La lomustina danneggia le cellule staminali emopoietiche, pertanto la mielosoppressione è in genere prolungata e cumulativa. Nel gatto la tossicità ematologica è più marcata ed il totale recupero si ha in genere dopo 6-7 settimane dalla somministrazione.¹⁴ Inoltre, sia nel cane sia nel gatto, può indurre epatotossicità cumulativa, pertanto è imperativa la valutazione della funzionalità epatica prima e durante ogni somministrazione.¹⁵

Antimetaboliti

Gli antimetaboliti interferiscono con le normali funzioni delle cellule, ed in modo particolare con la sintesi di DNA, processo essenziale ai fini della replicazione cellulare.¹

Gli antimetaboliti più utili nella pratica clinica sono gli *analoghi delle purine* (6-tioguanina, 6-mercaptopurina e azatioprina) o delle *pirimidine* (5-fluorouracile -5-FU-, citosina arabinoside -ara-C- e gemcitabina). Questi farmaci inibiscono la divisione cellulare attraverso due meccanismi fondamentali, ovvero impedendo la formazione di nucleotidi normali, o la formazione della seconda elica di DNA.¹ Gli *antifolati*, invece, non appartengono agli analoghi nucleosidici, ma prevengono la formazione dei folati ridotti, essenziali per la sintesi di DNA. Tra gli antifolati, il più noto è il metotrexate (MTX).¹

La maggior parte degli antimetaboliti è ciclo-specifica; la tossicità di questi farmaci si evidenzia soprattutto a carico di cellule rapidamente proliferanti, come quelle della mucosa gastroenterica e del midollo osseo. Tuttavia, non interagendo direttamente con il DNA, non sono responsabili degli effetti tardivi di cancerogenesi, precedentemente descritti.

Cruciale quando si somministrano gli antimetaboliti è la tempistica di somministrazione. Il picco di massima concentrazione ematica è infatti trascurabile, al contrario della durata di esposizione sopra il limite critico, requisito essenziale affinché vi sia l'effetto citotossico desiderato. Molti antimetaboliti devono pertanto essere somministrati a basse dosi ma ripetutamente o in infusione EV continua.¹

MTX è un analogo dell'acido folico (una vitamina) che penetra nelle cellule sfruttando il trasportatore dei folati ridotti; qui inibisce in modo competitivo la diidrofollato riduttasi, enzima essenziale per la riduzione dei folati e, in ultimo, per la biosintesi delle basi puriniche. Le purine non sono dunque più disponibili per la sintesi di DNA, questo effetto si traduce in morte cellulare.¹ MTX è selettivamente tossico per le cellule che sintetizzano DNA. MTX può essere somministrato sia per via orale, sia EV. È capace di penetrare la barriera ematoencefalica (BEE), ma raggiunge nel sistema nervoso centrale concentrazioni citotossiche soltanto se somministrato per via intratecale oppure ad elevate dosi EV. In seguito a metabolismo epatico, è eliminato con le urine sotto forma di principio attivo e di metabolita. La somministrazione concomitante di aspirina può esacerbare la tossicità di MTX, dal momento che ne riduce l'escrezione urinaria e ne altera il legame con le proteine plasmatiche. MTX è utilizzato in polichemioterapia per il trattamento di linfoma, osteosarcoma ed alcuni tumori solidi.²

5-FU assomiglia a uracile e timina, basi pirimidiniche di RNA e DNA, rispettivamente. In seguito a penetrazione

cellulare, 5-FU viene fosforilato e incorporato nell'RNA, impedendone la trascrizione (effetto fase-aspecifico), oppure interrompe la sintesi di DNA inibendo la timidilato sintetasi (TS), enzima coinvolto nella biosintesi delle pirimidine (effetto fase-S specifico).¹ In medicina veterinaria, 5-FU può essere utilizzato soltanto nel cane, mentre è fatale nel gatto a seguito di grave neurotossicità.² Le principali indicazioni sono: carcinomi gastroenterici ed epatocellulari (per via EV)^{2,16} e sarcomi dei tessuti molli (per via intraliesionale).¹⁷ La resistenza a 5-FU è secondaria all'aumentata espressione di TS nelle cellule tumorali.

Ara-C è un analogo pirimidinico che agisce durante la fase S del ciclo cellulare.¹ In seguito a penetrazione cellulare, *ara-C* viene fosforilata ed inibisce in maniera competitiva la DNA-polimerasi, enzima fondamentale per la sintesi di DNA. A causa della breve emivita plasmatica (pochi minuti), *ara-C* deve essere somministrata ripetutamente oppure in infusione EV continua.¹ I principali effetti collaterali sono mielosoppressione e tossicità gastroenterica. Nel cane e nel gatto *ara-C* è utilizzata principalmente per trattare linfomi con coinvolgimento midollare o neurologico e leucemie acute.¹⁸⁻²¹

Inibitori delle topoisomerasi

Le DNA topoisomerasi (TI) I e II sono enzimi ubiquitari il cui ruolo è svolgere le eliche di DNA per consentire la replicazione di DNA e la trascrizione di RNA. Gli inibitori di TI si legano al complesso DNA-TI, stabilizzandolo e prevenendo la riunione delle due eliche. L'effetto finale è la morte della cellula. Gli inibitori di TI-II sono substrato per la glicoproteina P e hanno pertanto il classico fenotipo MDR. La resistenza agli inibitori è secondaria a ridotti livelli di TI o a sue mutazioni.¹

La *doxorubicina* appartiene alle antracicline; il suo effetto citocida si esplica mediante interazione con TI-II, formazione di radicali liberi e alterazione della membrana cellulare. In seguito a somministrazione EV, la *doxorubicina* è ampiamente distribuita in tutto l'organismo; l'eliminazione è prevalentemente biliare.¹ La tossicità acuta include mielosoppressione, sintomi gastroenterici, necrosi tessutale in caso di stravasamento e alopecia.² La tossicità cumulativa è cardiaca nel cane e sembra essere secondaria alla formazione di radicali liberi, mentre è renale nel gatto.² La somministrazione di dexrazoxane poco prima di quella di *doxorubicina* è in grado di ridurre la tossicità cardiaca.²² La *doxorubicina* è ampiamente utilizzata in oncologia veterinaria, sia in mono- sia in polichemioterapia, ed è efficace contro vari carcinomi, sarcomi e neoplasie emopoietiche.²

Il *mitoxantrone* è un farmaco di sintesi caratterizzato da tre anelli planari che si intercalano nel DNA con preferenza per le basi guanina-citosina.¹ Può anche inibire TI-II. La tossicità principale è midollare, mentre nausea e vomito sono meno comuni. Il *mitoxantrone* è considerato meno efficace di *doxorubicina*, ma può essere utilizzato in sua alternativa in cani cardiopatici oppure in gatti nefropatici o inappetenti.²

Il *mitoxantrone* è utilizzato per il trattamento di vari carcinomi, in particolare squamocellulari, uroteliali e delle ghiandole apocrine dei sacchi anali.

Agenti antimicrotubulari

Includono gli alcaloidi della vinca ed i tassani (descritti nel prossimo paragrafo).

Gli alcaloidi della vinca (*vincristina*, *vinblastina* e *vinorelbina*), derivati naturali o semi-sintetici della pervinca, si legano alla tubulina impedendone la polimerizzazione e, quindi, la formazione dei microtubuli, interagendo così con la formazione del fuso mitotico durante la replicazione cellulare.¹ Sono pertanto farmaci ciclo-specifici e fase-specifici. I microtubuli sono importanti anche per il trasporto assonale nella cellula nervosa, pertanto è possibile osservare un danno neuronale durante la chemioterapia, che si manifesta con parestesie periferiche.^{1,2} Altri effetti tossici sono mielosoppressione e necrosi tessutale in caso di stravasamento.

In seguito a somministrazione EV, *vincristina* e *vinblastina* sono ampiamente distribuite, metabolizzate a livello epatico ed escrete con la bile. Nonostante le analogie strutturali, *vincristina* e *vinblastina* hanno uno spettro di attività differente. Infatti, mentre l'uso di *vincristina* è indicato per il trattamento di tumore venereo trasmissibile, vari carcinomi, linfoma e leucemie, la *vinblastina* è principalmente utilizzata per il trattamento di mastocitomi.²

Derivati del platino

Il cisplatino rappresenta il prototipo di questo gruppo e ha un ampio spettro antitumorale, tuttavia la tossicità non trascurabile limita il numero di pazienti che possono essere trattati. Notevoli sforzi sono stati fatti per individuare analoghi in grado di ridurre la tossicità mantenendo l'efficacia. L'analogo più utilizzato nella pratica clinica è il carboplatino.

Il *cisplatino* ha un meccanismo d'azione simile a quello degli agenti alchilanti classici e generalmente predilige il legame con le basi guanina ed adenina. In seguito a formazione di legami crociati intracatena e intercatena, il DNA viene danneggiato in modo irreversibile e la cellula non può più replicarsi.¹ Dopo somministrazione EV, il cisplatino si lega rapidamente ed in modo irreversibile alle proteine plasmatiche; il 90% di farmaco libero è eliminato nelle prime due ore, mentre l'emivita del cisplatino totale (libero e legato) è di circa 2 giorni. L'eliminazione è urinaria ed il 15% circa della dose somministrata è escretata nelle prime 24 ore. Il cisplatino è nefrotossico e deve essere somministrato in un protocollo di diuresi forzata; è inoltre molto emetico e mielosoppressivo.² Il cisplatino è fatale nella specie felina (fibrosi polmonare alla prima somministrazione).

Il *carboplatino* differisce dal cisplatino per la sostituzione di un gruppo chimico, ed è considerato un composto meno tossico del cisplatino, con efficacia comparabile o ridotta. Dopo somministrazione EV, l'eliminazione è urinaria sotto forma di composto non modificato. La tossicità principale è midollare (trombocitopenia), mentre la nefrotossicità è meno marcata, e non è richiesto alcun protocollo di diuresi.² Il carboplatino può essere somministrato nella specie felina, previa diluizione in destrosio 5% anziché in soluzione fisiologica per evitare la conversione in cisplatino. L'uso dei sali del platino è indicato per il trattamento di vari sarcomi e carcinomi.²

NUOVI FARMACI

Alcuni chemioterapici hanno arricchito significativamente l'armamentario terapeutico dell'oncologo medico; tra questi i più importanti sono: gemcitabina, dacarbazina, ifosfamide, vinorelbina, tassani (docetaxel e paclitaxel), carmustina e streptozotocina.

La letteratura scientifica offre ancora scarse informazioni, pertanto si consiglia di essere cauti se si contempla la possibilità di utilizzare questi farmaci.

Gemcitabina

La *gemcitabina* è un antimetabolita analogo delle pirimidine, che presenta analogie strutturali con ara-C, ma si differenzia da quest'ultima per attività antitumorale, in quanto più efficace contro i tumori solidi. In seguito a penetrazione cellulare, la gemcitabina è fosforilata: il metabolita difosfato inibisce la ribonucleotide riduttasi, mentre il metabolita trifosfato è incorporato nel DNA, impedendone la sintesi.^{1,14,23} Contrariamente all'uomo, nel cane la tossicità maggiore è gastroenterica. La gemcitabina è risultata efficace nel trattamento di carcinomi uroteliali, mammari e squamocellulari.^{14,23-28} Ha inoltre effetto radio-sensibilizzante.²⁹

Dacarbazina

La *dacarbazina* era stata originariamente sintetizzata come antimetabolita per inibire la biosintesi delle purine, invece forma un metabolita dalle proprietà alchilanti. L'uso è indicato per il trattamento di sarcomi,³⁰ linfomi (rescue)³¹ e melanomi. È fortemente emetica e la tossicità dose-limitante è midollare.

Ifosfamide

Ifosfamide (IFX) è un agente alchilante bifunzionale analogo di CTX privo di attività alchilante intrinseca, la cui attivazione richiede pertanto metabolismo epatico.¹ Sebbene IFX sia meno mielosoppressiva di CTX, la tossicità uroteliale è frequente e grave, pertanto deve essere somministrata in un protocollo di diuresi insieme ad un agente uroprotettore (Mesna), che lega l'acroleina a livello urinario, proteggendo la vescica da gravi alterazioni.^{14,23} Mesna è inattivo a livello plasmatico e viene convertito in forma attiva soltanto nelle urine, pertanto non influenza la citotossicità di IFX in altri distretti. Nel cane IFX è stata indagata per il trattamento di vari sarcomi, carcinomi e linfomi, con risultati incerti.^{32,33} È recente la segnalazione di sicurezza ed efficacia per il trattamento dei sarcomi iniettivi felini.^{34,35}

Carmustina

La *carmustina* appartiene, come la lomustina, alle nitrosouree, ma è un agente alchilante bifunzionale che può essere somministrato solo per via EV.¹ In medicina umana

la principale indicazione è il trattamento di tumori cerebrali e, ad alte dosi, di alcune neoplasie linfatiche.¹ In medicina veterinaria la carmustina è raramente utilizzata; in letteratura esistono solo segnalazioni in merito al suo potenziale utilizzo per il trattamento del linfoma nel cane³⁶ e, sotto forma di impianto a rilascio graduale, del melanoma orale.³⁷

Vinorelbina

Alcaloide della vinca semisintetico di più recente introduzione,²³ è utilizzata nel cane in monochemioterapia per il trattamento del carcinoma broncoalveolare.³⁶ La vinorelbina è somministrata per via EV ed è vasosclerotica. La principale tossicità è midollare, mentre la neurotossicità è rara per una minore affinità per i microtubuli assonali.

Tassani

I tassani includono paclitaxel e docetaxel, derivati di *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata*, rispettivamente. Si tratta di agenti anti-microtubulari che si legano alla tubulina in un punto diverso rispetto a quello degli alcaloidi della vinca.²³ Una volta penetrati nella cellula, formano aggregati di microtubuli, quindi ne inibiscono la depolimerizzazione e la normale degradazione richiesta per la divisione cellulare. Ne risultano mitosi aberranti o stati multinucleati con conseguente attivazione di caspasi e apoptosi.¹ Dopo somministrazione EV, i tassani sono ampiamente distribuiti; il metabolismo è epatico ed è mediato dagli enzimi citocromo P-450 dipendenti. Sia paclitaxel sia docetaxel sono substrato della glicoproteina P, pertanto subiscono i meccanismi di resistenza MDR.

Paclitaxel, il prototipo dei tassani, è formulato con un veicolo allergizzante (Cremoforo EL) che determina massiccia degranolazione dei mastociti.^{23,39} Per contrastare le reazioni da ipersensibilità, è necessario pretrattare i pazienti con antistaminici e steroidi e somministrare paclitaxel lentamente (3-24 ore). Paclitaxel può essere somministrato unicamente per EV. È in sperimentazione una nuova formulazione priva di Cremoforo EL.⁴⁰ Docetaxel è formulato con un veicolo diverso (polisorbato 80), anch'esso allergizzante. Docetaxel può essere somministrato per via EV e orale. La biodisponibilità orale è scarsa, ma può essere migliorata con la somministrazione concomitante di ciclosporina A, nell'uomo, nel cane e nel gatto.^{41,42}

L'uso dei tassani è indicato per il trattamento di neoplasie epiteliali, soprattutto mammarie.³⁹⁻⁴² Diversi trial clinici ne stanno valutando l'efficacia per altri tumori.

Streptozotocina

La *streptozotocina* è una metil-nitrosourea che ha effetto tossico diretto sulle cellule delle isole pancreatiche.¹⁴ In medicina umana si utilizza in prima linea per i tumori delle isole pancreatiche e gastroenterici endocrini. In medicina veterinaria ne è segnalato l'uso per il trattamento di insulinoemi metastatici soltanto nel cane.^{14,43} La streptozotocina è nefrotossica e deve essere somministrata in un pro-

toccolo di diuresi forzata.¹⁴ In seguito al trattamento, è possibile evocare ipoglicemia transitoria, secondaria a degranolazione delle cellule β pancreatiche con improvviso rilascio di insulina. Questa complicanza deve essere trattata con soluzioni glucosate.

NON NUOVI FARMACI, MA NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE: IL VECCHIO PER IL NUOVO

Chemioterapia metronomica

Per consentire alle cellule normali (essenzialmente midollari e gastroenteriche) danneggiate dalla chemioterapia di "recuperare", i chemioterapici possono essere somministrati soltanto ad intervalli ben precisi, cioè ciclicamente e non continuamente. Gli intervalli di recupero, utili alle cellule normali per la riparazione dei danni subiti, favoriscono sfortunatamente l'acquisizione, da parte delle cellule neoplastiche, di fenotipi chemioresistenti.

La *chemioterapia metronomica* cerca di aggirare questo ostacolo. La somministrazione degli stessi farmaci antitumorali, ma a dosaggi sub-citotossici ed in maniera continuativa o regolare, senza lunghi periodi di sospensione, eserciterebbe un effetto antiangiogenetico e pro-apoptotico, senza favorire l'insorgenza di farmaco-resistenza acquisita ed esercitando al tempo stesso attività antitumorale.^{23,44-48} Bersaglio della chemioterapia metronomica è l'endotelio dei tumori. Le cellule endoteliali intratumorali, infatti, contrariamente a quelle normali, proliferano rapidamente per sostenere l'apporto vascolare del tumore in crescita (neoangiogenesi), e risentono maggiormente degli effetti della chemioterapia.⁴⁴⁻⁴⁸ Oltre a bersagliare le cellule endoteliali, la chemioterapia metronomica sopprimerebbe il fenomeno metastatico attraverso l'inibizione della diffusione ematogena. La chemioterapia metronomica offre inoltre il vantaggio di indurre minore tossicità sistemica e migliore tollerabilità, con la possibilità di essere somministrata per periodi decisamente più lunghi ed eventualmente insieme a specifici agenti antiangiogenetici, per un effetto sinergico.

In medicina veterinaria la chemioterapia metronomica è ancora poco conosciuta ed in letteratura ci sono poche informazioni a riguardo.^{23,44}

Chemioterapia regionale

La chemioterapia sistemica si accompagna spesso a gravi effetti collaterali, dal momento che mostra effetti citotossici non solo nei confronti delle cellule neoplastiche, ma anche di quelle sane proliferanti.

Notevole interesse suscita la somministrazione del chemioterapico direttamente nella regione anatomica colpita. La chemioterapia regionale (intralesionale -IL-, intratumorale o intracavitaria) consiste nella somministrazione di un farmaco citotossico direttamente o sotto forma di impianto a rilascio graduale nel letto neoplastico o nella cavità interessata dalla proliferazione tumorale.²³ Si tratta di una via di somministrazione alternativa, che offre il vantaggio di raggiungere elevate concentrazioni di farmaco in corrispondenza della lesione neoplastica, potenziando l'efficacia

locale e diminuendo le concentrazioni sieriche e, di conseguenza, la tossicità sistemica. Il razionale farmacologico alla base della somministrazione regionale si basa sulla premessa che il tasso di clearance e scambio dal compartimento locale è inferiore rispetto alla clearance corporea totale, determinando una maggior concentrazione di farmaco citotossico in corrispondenza del tumore.^{49,50} È ovvio che tanto minore è la percentuale di scambio tra comparto regionale perfuso e circolo ematico sistemico, tanto maggiore è il vantaggio terapeutico.

La *chemioterapia IL* è in teoria una strategia antitumorale molto utile, tuttavia le segnalazioni in medicina veterinaria sono ancora sporadiche. La maggior parte dei lavori scientifici si riferisce alla somministrazione intratumorale di cisplatino per il trattamento di alcuni tumori solidi nel cane⁵¹⁻⁵⁵ e nel cavallo.⁵⁶⁻⁵⁸ Ulteriori esempi sono bleomicina IL nel cane per il trattamento di epulidi acantomatose ricorrenti,⁵⁹ carboplatino IL nel gatto per il trattamento di carcinomi squamocellulari del piano nasale,^{60,61} 5-FU IL per il trattamento di sarcoidi equini e sarcomi delle estremità nel cane.^{17,62}

La chemioterapia intracavitaria è somministrata direttamente in una cavità naturale del corpo, aggredendo le localizzazioni neoplastiche direttamente in queste sedi. È il caso, ad esempio, della cavità toracica o addominale per il trattamento di carcinomatosi, sarcomatosi o mesotelioma, o della vescica per il trattamento di carcinomi uroteliali superficiali.⁶³⁻⁶⁶ I farmaci che possono essere instillati nelle cavità naturali sono cisplatino, carboplatino, doxorubicina, gemcitabina e mitoxantrone.

Chemioterapia inalatoria

L'inalazione è una via comunemente utilizzata per somministrare antibiotici, broncodilatatori e steroidi direttamente al polmone, raggiungendo concentrazioni efficaci localmente e riducendo l'assorbimento e, di conseguenza, la tossicità sistemica. In oncologia si è proposto di nebulizzare chemioterapici o immunomodulatori (interleuchine) per il trattamento di neoplasie polmonari primitive o metastatiche.⁶⁷⁻⁶⁹ Per evitare la dispersione ambientale del chemioterapico, è necessario utilizzare apparecchiature designate a questo scopo. I chemioterapici nebulizzati utilizzati in medicina veterinaria sono doxorubicina e paclitaxel.⁶⁷ Oltre alla ridotta tossicità sistemica, i principali vantaggi sono l'estesa superficie polmonare disponibile per l'assorbimento del farmaco, il by-pass epatico o intestinale e la procedura non cruenta. I risultati fino ad ora ottenuti richiedono ulteriori sperimentazioni cliniche.

Nuovi sistemi di rilascio: liposomi

Lo sviluppo della ricerca oncologica si è concentrato sullo sviluppo di innovativi sistemi di coniugazione per migliorare il comportamento cinetico dei chemioterapici in vivo, modificare la tossicità del trattamento riducendo il picco di concentrazione plasmatica, e alterare la tempistica di somministrazione.²³

I liposomi sono piccole sfere fosfolipidiche. Via via che le sfere si aprono, il chemioterapico in esse contenuto vie-

ne rilasciato gradualmente e direttamente nelle cellule. Fase critica ai fini dell'efficacia è l' "internalizzazione" dei liposomi nelle cellule bersaglio. Infatti, sebbene la tossicità sia ridotta, il principale svantaggio è rappresentato dal sistema immunitario, che riconosce i liposomi come estranei, attivando il sistema reticolo-endoteliale prevalentemente in sede epatica e splenica. Inoltre, la tossicità è rivolta contro tutte le cellule indistintamente.²³

I liposomi rivestiti da una pellicola di polietilenglicole (PEG) aggirano questo ostacolo, dal momento che risultano essere inerti e non attivano il sistema immunitario. Per la loro capacità di by-passare la sorveglianza immunologica, vengono chiamati liposomi "stealth" ("cauti"). I liposomi PEG circolano dunque senza essere distrutti per tempi maggiori e raggiungono le cellule neoplastiche, in cui penetrano gradualmente. Il rilascio di chemioterapico avviene selettivamente nelle cellule neoplastiche, dal momento che i capillari che vascolarizzano il tumore, tipicamente più permeabili, favoriscono l'accumulo dei liposomi PEG nel tumore.⁷⁰⁻⁷²

L'esperienza in medicina veterinaria si limita all'utilizzo di doxorubicina e cisplatino incapsulati in liposomi PEG.^{71,72} La tossicità sistemica è drasticamente ridotta: ad esempio, il cisplatino incapsulato (SPI-77) può essere somministrato in sicurezza a dosaggi molto elevati senza protocollo di diuresi.⁷² L'utilizzo di doxorubicina incapsulata (Doxil®) non comporta tossicità cardiaca, tuttavia l'eventuale insorgenza di sindrome di eritrodisestesia palmare è dose-limitante.⁷¹ I liposomi semplici rappresentano invece il veicolo ideale per trasportare modificatori della risposta biologica (come ad esempio L-MTP-PE), dal momento che sono prontamente captati dal sistema reticolo-endoteliale.⁷³⁻⁷⁶

TERAPIA MOLECOLARE

La ricerca in ambito oncologico ha fatto enormi progressi negli ultimi anni, consentendo di individuare bersagli (target) cellulari sensibili a nuove strategie terapeutiche. Lo sviluppo recente di terapie molecolari deriva dalla conoscenza sempre più approfondita dei pattern metabolici, delle caratteristiche enzimatiche e dell'assetto recettoriale delle cellule neoplastiche e dei siti molecolari critici per gli eventi proliferativi. Ancora, la comprensione dei meccanismi che regolano crescita, sopravvivenza, capacità invasiva, metastatica e angiogenetica delle cellule neoplastiche ha consentito di sviluppare agenti in grado di bloccare i vari percorsi.

L'enorme vantaggio della terapia oncologica mirata consiste nella selettività del bersaglio, dal momento che sono inibiti o alterati soltanto i meccanismi molecolari o alcune proteine alla base della trasformazione neoplastica. È noto che la chemioterapia ha una limitata finestra terapeutica perché non è in grado di risparmiare le cellule sane dell'organismo; al contrario, la terapia molecolare si pone l'obiettivo di colpire selettivamente, efficacemente e definitivamente le cellule neoplastiche, senza determinare alcun danno a carico delle cellule sane. Le cosiddette "molecole intelligenti" o "magic bullets" farmacologici segnano pertanto l'inizio dell'era dell'oncologia moderna. Lo sviluppo di questa nuova categoria di farmaci è un processo a tap-

pe, che prevede innanzitutto l'individuazione del target tumorale e, in seguito, la molecola in grado di inibirlo. I principali target tumorali fino ad oggi identificati sono i recettori per fattori di crescita ad attività tirosinchinasica, i meccanismi di trasduzione del segnale, alcune proteine del ciclo cellulare, i recettori che regolano angiogenesi e apoptosi. In seguito a questa prima fase preclinica, è richiesta la tappa clinica per dimostrare sicurezza ed efficacia del farmaco sul paziente.

Seppur salutata con grande entusiasmo ed ottimismo in oncologia umana, la terapia molecolare è ancora in parte utopistica in medicina veterinaria. Le maggiori problematiche riguardano le tecnologie laboratoristiche e i costi della terapia.

FARMACI A BERSAGLIO BIOMOLECOLARE

Gli agenti antitumorali di nuova generazione, volti a bersagliare le cellule tumorali in maniera selettiva riducendo la tossicità del trattamento, comprendono anticorpi monoclonali e piccole molecole ad attività inibente.⁷⁷⁻⁷⁹

Anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali (MAb) sono prodotti a partire da una plasmacellula resa immortale ed espansa in modo clonale che produce un anticorpo specifico contro una proteina. Di conseguenza, il MAb mostra elevata affinità e specificità per quella particolare proteina.

I MAb sono molecole grosse con elevato peso molecolare (PM), pertanto non possono essere somministrati per via orale (perché verrebbero digeriti nell'intestino), ma soltanto per via parenterale. Inoltre, sempre a seguito delle grosse dimensioni, non penetrano all'interno delle cellule. I MAb sono dunque diretti verso la porzione esterna (dominio extracellulare) del recettore coinvolto nella regolazione neoplastica. Una volta occupato dal MAb, il dominio non è più disponibile per il ligando naturale: il recettore non viene attivato ed il segnale di crescita cellulare è di conseguenza silenziato.⁷⁷

Alcuni esempi importanti in medicina umana sono trastuzumab (Herceptin®), cetuximab (Erbix®), bevacizumab (Avastin®) e rituximab (Rituxan®, Mabthera®), tutti MAb che hanno dato eccellenti risultati in clinica.

Trastuzumab è un MAb ricombinante che si lega al dominio extracellulare del recettore HER2. HER2 è codificato dal proto-oncogene c-erbB-2 o *Neu*. Tale gene è amplificato nel 20-30% dei tumori mammari della donna, e di conseguenza si ha sovra-espressione di HER2 sulla superficie delle cellule neoplastiche. Non esistendo un ligando per HER2, il meccanismo d'azione di trastuzumab non si esplica mediante competizione inibitiva, bensì mediante internalizzazione e successiva degradazione endocitica di HER2.⁷⁸ Nella donna con tumore mammario che sovra-esprime HER2 la prognosi è tendenzialmente sfavorevole, perché predittiva di scarsa risposta a trattamenti chemioterapici e ormonali.⁷⁸ Nel cane e nel gatto HER2 è sovra-espresso in alcuni tumori mammari^{80,81} e osteosarcoma del cane⁸² dove assume significato prognostico sfavorevole. Trastuzumab è registrato in medicina umana per il tratta-

mento del carcinoma mammario avanzato con sovra-espressione di HER2. Trastuzumab è inoltre oggetto di studio per il trattamento di altri tumori con sovra-espressione di HER2.⁷⁸

Cetuximab si lega al dominio extracellulare del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), inibendo il legame tra recettore ed EGFR (inibizione competitiva) e silenziando il segnale proliferativo. In medicina umana è approvato per il trattamento del carcinoma coloretale metastatico.⁷⁸

Bevacizumab è diretto contro il recettore del fattore di crescita vascolare (VEGF), importante promotore di angiogenesi in diversi tumori. Bevacizumab agisce sul recettore per inibizione competitiva del ligando, inibendo la neoangiogenesi. In medicina umana ne è approvato l'utilizzo per il carcinoma coloretale metastatico.⁷⁸

Rituximab, un MAb chimerico anti-CD20, ha rivoluzionato il modo di affrontare le malattie linfoproliferative dell'uomo, in modo particolare i linfomi non-Hodgkin.⁸³ Infatti, dalla concezione di malattia non eradicabile, si è passati alla possibilità di guarigione in una parte di pazienti. Il ruolo terapeutico di rituximab è stato valutato *in vitro* per il trattamento di linfomi canini: pur immuno-esprimendo CD20, le cellule neoplastiche non sono in grado di legarsi al MAb, pertanto rituximab non trova applicazione clinica in veterinaria.⁸⁴

In medicina veterinaria, *MAB 231* ha dato invece importanti risultati nel trattamento del linfoma del cane, se utilizzato insieme alla chemioterapia, migliorando sia intervallo libero da malattia sia sopravvivenza.⁸⁵ *MAB 231* non è più in commercio.

Piccole molecole ad attività inibente

Le piccole molecole ad attività inibente hanno basso PM (400 Da), pertanto possono essere somministrate per via orale perché subito assorbite senza degradazione intestinale. Potendo entrare all'interno delle cellule, le piccole molecole ad attività inibente agiscono interagendo con il dominio tirosinchinasico intracellulare di un recettore transmembrana.⁷⁷

I recettori per le tirosin-chinasi rappresentano eccellenti bersagli nella terapia molecolare, dal momento che sono coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare e sono spesso amplificati nei tumori maligni.^{79,86}

Gli inibitori tirosinchinasici approvati nell'uomo sono imatinib (Glivec®), gefitinib (Iressa®) ed erlotinib (Tarceva®).

Imatinib inibisce le proteinchinasi BCR-ABL, PDGFR e KIT, ed è approvato nell'uomo per il trattamento di leucemia mieloide cronica (CML) con cromosoma aberrante (Philadelphia+) e tumori gastroenterici stromali (GIST) che mostrano mutazioni puntiformi del recettore tirosinchinasico c-KIT o di PDGFR.^{77,86} Nel 90% dei pazienti con CML si ha traslocazione tra cromosoma 9 e 22, con conseguente fusione del gene codificante per la tirosinchinasi ABL (normalmente localizzato sul cromosoma 9) con il gene BCR (normalmente localizzato sul cromosoma 22), e conseguente formazione dell'oncogene chimerico di fusione BCR-ABL. Imatinib inibisce BCR-ABL, determinando nei pazienti trattati non in crisi blastica remissione citogenetica.

L'uso di imatinib è indicato anche per il trattamento di leucemia mielomonocitica cronica (che mostra traslocazione cromosomica coinvolgente il recettore PDGFR) e sindrome ipereosinofila (in cui si hanno riarrangiamenti di PDGFR).

In medicina veterinaria, imatinib può essere utilizzato per il trattamento di mastocitomi che mostrano amplificazione e distribuzione anomala di KIT, a seguito di mutazioni con acquisizione di funzione a carico del proto-oncogene c-kit.⁸⁷⁻⁸⁹ In genere, la presenza di mutazioni di c-kit si correla a grado istologico elevato e, in ultimo, a comportamento biologico più aggressivo.⁸⁹ Diverse sperimentazioni ne stanno valutando l'efficacia ed i risultati preliminari sono incoraggianti.^{90,91} L'espressione di KIT nei GIST del cane suggerisce la possibilità di trattamento con farmaci a bersaglio molecolare.⁹²

Sia *gefitinib* sia *erlotinib* sono approvati in medicina umana per il trattamento del carcinoma polmonare non a piccole cellule,⁷⁷ mentre in medicina veterinaria ancora non esistono segnalazioni in merito.

Parole chiave

Chemioterapia, terapia a bersaglio molecolare, cancro.

Key words

Chemotherapy, molecular therapy, cancer.

Bibliografia

- Perry MC: The Chemotherapy Source Book. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- Chun R, Garrett LD, Vail DM: Cancer chemotherapy. In: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. Ed SJ Withrow, DM Vail. St Louis, Missouri, Saunders Elsevier, 2007, pp 163-192.
- de Lorimier LP: Updates on the management of canine epitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 36(1):213-228, 2006.
- Rassnick KM, Mauldin GE, Al-Sarraf R, et al: MOPP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases (1989-2000). *JVIM* 16(5):576-580, 2002.
- Polton GA, Brearley MJ: Clinical stage, therapy, and prognosis in canine anal sac gland carcinoma. *JVIM* 21(2):274-280, 2007.
- Emms SG: Anal sac tumours of the dog and their response to cytoreductive surgery and chemotherapy. *Aust Vet J.* 83(6):340-343, 2005.
- Alvarez FJ, Kisseberth WC, Gallant SL, Couto CG: Dexamethasone, melphalan, actinomycin D, cytosine arabinoside (DMAC) protocol for dogs with relapsed lymphoma. *JVIM* 20(5):1178-1183, 2006.
- Moore AS, London CA, Wood CA, et al: Lomustine (CCNU) for the treatment of resistant lymphoma in dogs. *JVIM* 13(5): 395-398, 1999.
- Saba CF, Thamm DH, Vail DM: Combination chemotherapy with L-asparaginase, lomustine, and prednisone for relapsed or refractory canine lymphoma. *JVIM* 21(1):127-132, 2007.
- Williams LE, Rassnick KM, Power HT, et al: CCNU in the treatment of canine epitheliotropic lymphoma. *JVIM* 20(1):136-143, 2006.
- Risbon RE, de Lorimier LP, Skorupski K, et al: Response of canine cutaneous epitheliotropic lymphoma to lomustine (CCNU): a retrospective study of 46 cases (1999-2004). *JVIM* 20(6):1389-1397, 2006.
- Skorupski KA, Clifford CA, Paoloni MC, et al: CCNU for the treatment of dogs with histiocytic sarcoma. *JVIM* 21(1):121-126, 2007.
- Rassnick KM, Moore AS, Williams LE, et al: Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (lomustine). *JVIM* 13(6):601-605, 1999.
- Moore AS, Kitchell BE: New chemotherapy agents in veterinary medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 33(3):629-649, 2003.
- Kristal O, Rassnick KM, Gliatto JM, et al: Hepatotoxicity associated with CCNU (lomustine) chemotherapy in dogs. *JVIM* 18(1):75-80, 2004.

16. Stancliff RM, Gilson SD: Use of cisplatin, 5-fluorouracil, and second-look laparotomy for the management of gastrointestinal adenocarcinoma in three dogs. *JAVMA* 225(9):1412-1417, 2004.
17. Marconato L, Comastri S, Lorenzo MR, et al. Postsurgical intra-incisional 5-fluorouracil in dogs with incompletely resected, extremity malignant spindle cell tumours: a pilot study. *Veterinary and Comparative Oncology*. In press.
18. Ruslander D, Moore AS, Gliatto JM, et al: Cytosine arabinoside as a single agent for the induction of remission in canine lymphoma. *JVIM* 8(4): 299-301, 1994.
19. Alvarez FJ, Kisseberth WC, Gallant SL, Couto CG. Dexamethasone, melphalan, actinomycin D, cytosine arabinoside (DMAC) protocol for dogs with relapsed lymphoma. *JVIM* 20(5): 1178-1183, 2006.
20. Couto CG, Cullen J, Pedroia V, Turrel JM. Central nervous system lymphosarcoma in the dog. *JAVMA* 184: 809-813, 1984.
21. Marconato L, Bonfanti U, Stefanello D, et al. Cytosine arabinoside in additino to VCAA-based protocols for the treatment of canine lymphoma with bone marrow involvement: does it make the difference? *Veterinary and Comparative Oncology*. In press.
22. Baldwin JR, Phillips BA, Overmyer SK, et al: Influence of the cardioprotective agent dexrazoxane on doxorubicin pharmacokinetics in the dog. *Cancer Chemother Pharmacol*. 30(6):433-438, 1992.
23. Vail DM, Thamm DH: Cytotoxic chemotherapy: new players, new tactics. *JAAHA* 41(4):209-214, 2005.
24. Turner AI, Hahn KA, Rusk A, et al: Single agent gemcitabine chemotherapy in dogs with spontaneously occurring lymphoma. *JVIM* 20(6):1384-1388, 2006.
25. Kosarek CE, Kisseberth WC, Gallant SL, et al: Clinical evaluation of gemcitabine in dogs with spontaneously occurring malignancies. *JVIM* 19(1):81-86, 2005.
26. Marconato L, Lindner DL, Suslak-Brown L, et al: A phase I clinical trial of high dose gemcitabine in 33 dogs with transitional cell carcinoma. 22nd Annual Conference of the Veterinary Cancer Society, New York, 2002, p 9.
27. Marconato L, Lorenzo MR, Abramo F, et al: Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumors in dogs. Annual Congress of the European Society of Veterinary Oncology, Cambridge, 2007, p 16.
28. LeBlanc AK, LaDue TA, Turrel JM, et al: Unexpected toxicity following use of gemcitabine as a radiosensitizer in head and neck carcinomas: a veterinary radiation therapy oncology group pilot study. *Vet Radiol Ultrasound*. 45(5):466-470, 2004.
29. Jones PD, de Lorimier LP, Kitchell BE, et al: Gemcitabine as a radiosensitizer for nonresectable feline oral squamous cell carcinoma. *JAAHA* 39(5):463-467, 2003.
30. Ahaus EA, Couto CG, Valerius KD: Hematological toxicity of doxorubicin-containing protocols in dogs with spontaneously occurring malignant tumors. *JAAHA* 36(5):422-426, 2000.
31. Van Vechten M, Helfand SC, Jeglum KA: Treatment of relapsed canine lymphoma with doxorubicin and dacarbazine. *JVIM* 4(4):187-191, 1990.
32. Rassnick KM, Frimberger AE, Wood CA, et al: Evaluation of ifosfamide for treatment of various canine neoplasms. *JVIM* 14(3):271-276, 2000.
33. Payne SE, Rassnick KM, Northrup NC, et al: Treatment of vascular and soft-tissue sarcomas in dogs using an alternating protocol of ifosfamide and doxorubicin. *VCO* 1(4): 171-179, 2003.
34. Rassnick KM, Moore AS, Northrup NC, et al: Phase I trial and pharmacokinetic analysis of ifosfamide in cats with sarcomas. *AJVR* 67(3):510-516, 2006.
35. Rassnick KM, Rodriguez CO, Khanna C, et al: Results of a phase II clinical trial on the use of ifosfamide for treatment of cats with vaccine-associated sarcomas. *AJVR* 67(3):517-523, 2006.
36. Ricci Lucas SR, Pereira Coelho BM, Marquezi ML, et al: Carmustine, vincristine, and prednisone in the treatment of canine lymphosarcoma. *JAAHA* 40(4):292-299, 2004.
37. Kitchell BE, Brown DM, Luck EE, et al: Intralesional implant for treatment of primary oral malignant melanoma in dogs. *JAVMA* 204(2):229-236, 1994.
38. Poirier VJ, Burgess KE, Adams WM, et al: Toxicity, dosage, and efficacy of vinorelbine (Navelbine) in dogs with spontaneous neoplasia. *JVIM* 18(4):536-539, 2004.
39. Poirier VJ, Hershey AE, Burgess KE, et al: Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors. *JVIM* 18(2):219-222, 2004.
40. Rivera P, Haggstrom J, Nyman H, et al: Efficacy and toxicity of a new formulation of paclitaxel (Paclical® Vet) in a phase I-II study for the treatment of malignant tumours in dogs. Annual Congress of the European Society of Veterinary Oncology, Cambridge, 2007, p 26
41. Simon D, Schoenrock D, Baumgartner W, et al: Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *JVIM* 20(5):1184-1190, 2006.
42. McEntee MC, Rassnick KM, Lewis LD, et al: Phase I and pharmacokinetic evaluation of the combination of orally administered docetaxel and cyclosporin A in tumor-bearing dogs. *AJVR* 67(6):1057-1062, 2006.
43. Moore AS, Nelson RW, Henry CJ, et al: Streptozocin for treatment of pancreatic islet cell tumors in dogs: 17 cases (1989-1999). *JAVMA* 221(6):811-818, 2002.
44. Mutsaers AJ: Less is more: the science (more or less) behind metronomic chemotherapy. *VCS Newsletter* 30(1):1-6, 2006.
45. Laquente B, Vinals F, Germa JR: Metronomic chemotherapy: an antiangiogenic scheduling. *Clin Transl Oncol*. 9(2):93-98, 2007.
46. Gasparini G: Metronomic scheduling: the future of chemotherapy? *Lancet Oncol*. 2(12):733-740, 2001.
47. Gille J, Spieth K, Kaufmann R: Metronomic low-dose chemotherapy as antiangiogenic therapeutic strategy for cancer. *J Dtsch Dermatol Ges*. 3(1):26-32, 2005.
48. Shimizu K, Asai T, Oku N: Antineovascular therapy, a novel antiangiogenic approach. *Expert Opin Ther Targets*. 9(1):63-76, 2005.
49. Collins JM: Pharmacologic rationale for regional drug delivery. *J Clin Oncol* 2(5): 498-504, 1984.
50. Ensminger WD, Gyves JW: Regional chemotherapy of neoplastic diseases. *Pharmacol Ther* 21(2): 277-293, 1983.
51. Théon AP, Madewell BR, Ryu J et al: Concurrent irradiation and intratumoral chemotherapy with cisplatin: a pilot study in dogs with spontaneous tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 29(5): 1027-1034, 1994.
52. Kitchell BE, Brown DM, Luck EE, et al: Intralesional implant for treatment of primary oral malignant melanoma in dogs. *JAVMA* 204(2): 229-236, 1994.
53. Hahn KA, Richardson RC, Blevins WE, et al: Intramedullary cisplatin chemotherapy: experience in four dogs with osteosarcoma. *JSAP* 37(4): 187-192, 1996.
54. Withrow SJ, Liptak JM, Straw RC, et al: Biodegradable cisplatin polymer in limb-sparing surgery for canine osteosarcoma. *Ann Surg Oncol* 11(7): 705-713, 2004.
55. Lana SE, Dernel WS, LaRue SM, et al. Slow release cisplatin combined with radiation for the treatment of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 38(6): 474-478, 1997.
56. Theon AP, Pascoe JR, Meagher DM: Perioperative intratumoral administration of cisplatin for treatment of cutaneous tumors in equidae. *JAVMA* 205(8): 1170-1176, 1994.
57. Theon AP, Pascoe JR, Madigan JE, et al: Comparison of intratumoral administration of cisplatin versus bleomycin for treatment of periocular squamous cell carcinomas in horses. *AJVR* 58(4): 431-436, 1997.
58. Theon AP, Pascoe JR, Galuppo LD, et al: Comparison of perioperative versus postoperative intratumoral administration of cisplatin for treatment of cutaneous sarcoids and squamous cell carcinomas in horses. *JAVMA* 215(11): 1655-1660, 1999.
59. Yoshida K, Watarai Y, Sakai Y, et al: The effect of intralesional bleomycin on canine acanthomatous epulis. *JAAHA* 34(6): 457-461, 1998.
60. Theon AP, VanVechten MK, Madewell BR: Intratumoral administration of carboplatin for treatment of squamous cell carcinomas of the nasal plane in cats. *AJVR* 57(2): 205-210, 1996.
61. De Vos JP, Burm AGO, Focker BP: Results from the treatment of advanced stage squamous cell carcinoma of the nasal planum in cats, using a combination of intralesional carboplatin and superficial radiotherapy: a pilot study. *VCO* 2(2): 75-81, 2004.
62. Stewart AA, Rush B, Davis E. The efficacy of intratumoral 5-fluorouracil for the treatment of equine sarcoids. *Aust Vet J* 84(3): 101-106, 2006.
63. Clifford CA, Mackin AJ, Henry CJ: Treatment of canine hemangiosarcoma: 2000 and beyond. *JVIM* 14(5):479-485, 2000.
64. Moore AS, Kirk C, Cardona A: Intracavitary cisplatin chemotherapy experience with six dogs. *JVIM* 5(4):227-231, 1991.
65. Charney SC, Bergman PJ, McKnight JA, et al: Evaluation of intracavitary mitoxantrone and carboplatin for treatment of carcinomatosis, sarcomatosis and mesothelioma, with or without malignant effusions: A retrospective analysis of 12 cases (1997-2002). *Veterinary and Comparative Oncology* 3(4): 171-181, 2005.
66. Cozzi PJ, Bajorin DF, Tong W, et al: Toxicology and pharmacokinetics of intravesical gemcitabine: a preclinical study in dogs. *Clin Cancer Res*. 5(9):2629-2637, 1999.
67. Hershey AE, Kurzman ID, Forrest LJ, et al: Inhalation chemotherapy for macroscopic primary or metastatic lung tumors: proof of principle using dogs with spontaneously occurring tumors as a model. *Clin Cancer Res*. 5(9):2653-2659, 1999.
68. Khanna C, Vail DM: Targeting the lung: preclinical and comparative evaluation of anticancer aerosols in dogs with naturally occurring cancers. *Curr Cancer Drug Targets*. 3(4):265-273, 2003.
69. Khanna C, Anderson PM, Hasz DE, et al: Interleukin-2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases. *Cancer* 79(7):1409-1421, 1997.
70. Gabizon AA: Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer Invest*. 19(4):424-436, 2001.

71. Vail DM, Kravis LD, Cooley AJ, et al: Preclinical trial of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes in dogs with spontaneously arising malignant tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 39(5):410-416, 1997.
72. Vail DM, Kurzman ID, Glawe PC, et al: STEALTH liposome-encapsulated cisplatin (SPI-77) versus carboplatin as adjuvant therapy for spontaneously arising osteosarcoma (OSA) in the dog: a randomized multicenter clinical trial. *Cancer Chemother Pharmacol.* 50(2):131-136, 2002.
73. MacEwen EG, Kurzman ID, Vail DM, et al: Adjuvant therapy for melanoma in dogs: results of randomized clinical trials using surgery, liposome-encapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res.* 5(12):4249-4258, 1999.
74. Teske E, Rutteman GR, vd Ingh TS, et al: Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (L-MTP-PE): a randomized clinical trial in dogs with mammary carcinoma. *Anticancer Res.* 18(2A):1015-1019, 1998.
75. Kurzman ID, MacEwen EG, Rosenthal RC, et al: Adjuvant therapy for osteosarcoma in dogs: results of randomized clinical trials using combined liposome-encapsulated muramyl tripeptide and cisplatin. *Clin Cancer Res.* 1(12):1595-1601, 1995.
76. Vail DM, MacEwen EG, Kurzman ID, et al: Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine adjuvant immunotherapy for splenic hemangiosarcoma in the dog: a randomized multi-institutional clinical trial. *Clin Cancer Res.* 1(10):1165-1170, 1995.
77. Cross SS: The molecular pathology of new anti-cancer agents. *Current Diagnostic Pathology* 11(5):329-339, 2005.
78. Adams GP, Weiner LM: Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol.* 23(9):1147-1157, 2005.
79. London CA: Kinase inhibitors in cancer therapy. *VCO* 2(4): 177-193, 2004.
80. Ahern TE, Bird RC, Bird AE, Wolfe LG: Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Am J Vet Res.* 57(5):693-696, 1996.
81. Martin de las Mulas J, Ordas J, Millan Y, et al: Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat.* 80(3):363-367, 2003.
82. Flint AF, U'Ren L, Legare ME, et al: Overexpression of the erbB-2 proto-oncogene in canine osteosarcoma cell lines and tumors. *Vet Pathol.* 41(3):291-296, 2004.
83. Traulle C, Coiffier BB: Evolving role of rituximab in the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Future Oncol.* 1(3):297-306, 2005.
84. Impellizzeri JA, Howell K, McKeever KP, et al. The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: an ex vivo evaluation. *Vet J.* 171(3):556-558, 2006.
85. Jeglum KA. Chemoimmunotherapy of canine lymphoma with adjuvant canine monoclonal antibody 231. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 26(1):73-85, 1996.
86. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A: The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 4(5):361-370, 2004.
87. Reguera MJ, Ferrer L, Rabanal RM. Evaluation of an intron deletion in the c-kit gene of canine mast cell tumors. *AJVR* 63(9):1257-1261, 2002.
88. Downing S, Chien MB, Kass PH, et al. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *AJVR* 63(12):1718-1723, 2002.
89. Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet Pathol.* 39(5):529-535, 2002.
90. Pryer NK, Lee LB, Zadovskaya R, et al. Proof of target for SU11654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. *Clin Cancer Res.* 9(15):5729-5734, 2003.
91. London CA, Hannah AL, Zadovskaya R, et. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin Cancer Res.* 9(7):2755-2768, 2003.
92. Bettini G, Morini M, Marcato PS: Gastrointestinal spindle cell tumours of the dog: histological and immunohistochemical study. *J Comp Path* 129(4): 283-293, 2003.