

Staging iniziale e finale del linfoma del cane: l'essenziale in breve e alla portata di tutti



Il linfoma del cane resta una tra le neoplasie più frequentemente diagnosticate. Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi in campo terapeutico, che impongono necessariamente un preciso inquadramento in prima presentazione, ma anche una corretta valutazione di risposta al trattamento. Questa review focalizza sullo staging del linfoma del cane, sia alla diagnosi, per definire prognosi e trattamento più idoneo, sia dopo la terapia, per valutare la risposta al trattamento.



Laura Marconato,
Med Vet,
Dipl. ECVIM-CA
(Oncology)

INTRODUZIONE ALLA STADIAZIONE IN ONCOLOGIA

La stadiazione in oncologia rappresenta la valutazione dell'estensione anatomica di una neoplasia e permette di definire in modo standardizzato quanto è voluminoso e diffuso il tumore al momento della diagnosi.

La stadiazione è pertanto una tappa fondamentale ed irrinunciabile nella gestione di qualunque paziente oncologico, poiché fornisce le informazioni con cui viene scelta la terapia, definita la prognosi, valutati i risultati di trattamento, scambiate informazioni tra diversi centri oncologici e facilitata la ricerca.

La stadiazione clinica del paziente oncologico è essenziale per formulare una prognosi, definire un piano terapeutico complessivo basato sullo stadio raggiunto dal cancro e modificare la terapia ed il suo intento in caso di particolari istotipi.

Non da ultimo, poiché l'eutanasia può essere scelta in medicina veterinaria, è importante che il proprietario abbia a disposizione tutti gli elementi per scegliere il più serenamente possibile.

Pertanto, i medici veterinari che gestiscono pazienti oncologici devono abituarsi a ricercare e registrare i dati di

stadiazione, dal momento che questi rappresentano il corredo minimo di informazioni per affrontare ogni singolo caso.

Esattamente come per tutti gli altri tumori maligni, anche per il linfoma del cane la stadiazione prima dell'inizio di qualsiasi trattamento chemioterapico, inclusi i corticosteroidi, è importante non solo per confermare la diagnosi, ma anche per stabilire la prognosi e l'estensione, fattori che guidano le decisioni terapeutiche. Conoscere esattamente dove è distribuito il linfoma al momento della diagnosi facilita inoltre la valutazione di risposta alla terapia (end-staging: stadiazione al termine del trattamento) e permette di prendere una decisione in merito ad eventuali terapie di mantenimento o di salvataggio.¹

STAGING INIZIALE

Il linfoma del cane può presentarsi sotto varie forme cliniche:

- Linfoma multicentrico (la più comune). Aumento di tutti i linfonodi esplorabili, intratoracici e addominali (Figura 1). I sintomi sono per lo più lievi e aspecifici.
- Linfoma mediastinico. Forma non comune che si contraddistingue per il coinvolgimento primario del linfonodo mediastinico craniale oppure del timo o di entrambi (Figura 2). Il cane può manifestare di-



Figura 1 - Linfoma multicentrico in un cane. Si noti la marcata linfoadenomegalia mandibolare con edema del collo secondario.

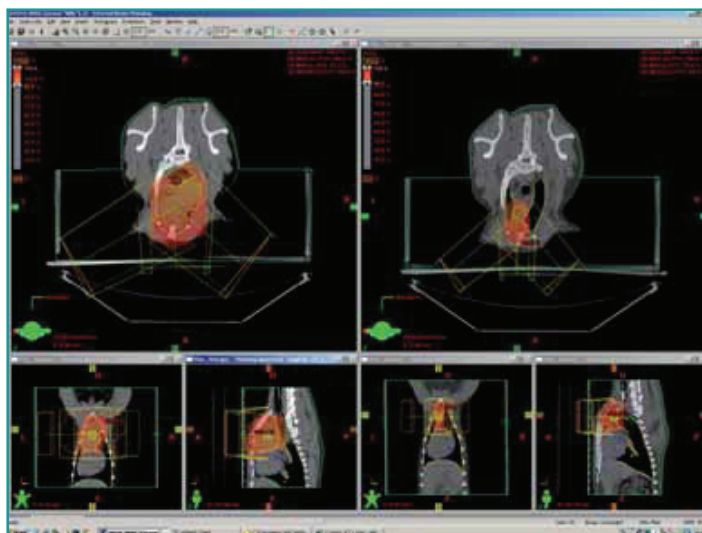


Figura 2 - Immagini TC di un linfoma mediastinico in un cane. A sinistra, prima della radioterapia; a destra, dopo radioterapia (remissione parziale, come evidenziato dalla riduzione volumetrica della neoplasia).

spnea, sindrome della vena cava superiore, oppure poliuria e polidipsia spesso secondari all'ipercalcemia paraneoplastica.

- Linfoma alimentare. Contrariamente al gatto, la sede intestinale primitiva è infrequente nella specie canina, e a prognosi sfavorevole (Figura 3).¹⁰ Soltanto la sede rettale sembrerebbe associarsi a prognosi più favorevole.¹¹
- Linfoma cutaneo. Infrequente, si presenta in forma epiteliotropa (Figura 4) e non epiteliotropa (Figura 5). La prognosi è tendenzialmente sfavorevole.



Figura 3 - Linfoma intestinale in un cane.

L'esame obiettivo generale rappresenta il primo strumento che orienta il clinico all'elenco di diagnosi differenziali che, a loro volta, consentiranno di scegliere l'iter diagnostico più idoneo a stabilire estensione di malattia e diagnosi di certezza. Le indagini in seguito descritte non richiedono necessariamente il coinvolgimento dello specialista.

1. Anamnesi accurata e valutazione di possibili fattori di rischio ambientali.

L'eziologia dei linfomi è ad oggi sconosciuta, ma verosimilmente multifattoriale, ascrivibile a fattori genetici e molecolari,²⁻⁵ infettivi (*Helicobacter pylori* nel linfoma gastrico),⁶ ambientali (esposizione a diossina o erbicidi),^{7,8}

La stadiazione comincia con un'anamnesi accurata, un esame obiettivo generale preciso, che consente di ipotizzare la forma anatomica, l'esame emocromocitometrico con la valutazione dello striscio periferico, l'esame ematochimico e l'esame delle urine.

ed immunitari.⁹ In particolare, i fattori ambientali rappresentano un aspetto molto importante, non solo per la clinica e la patologia del cane, ma per i potenziali aspetti comparativi e di monitoraggio ambientale che potenzialmente ne possono derivare. Infatti, uomo e cane condividono gran parte dei fattori di rischio e sono suscettibili alle stesse tipologie neoplastiche, tuttavia il cane non indulge in fattori occupazionali ed abitudini di vita considerati fattori di rischio per lo sviluppo delle neoplasie, cui si aggiunge la vita media più breve che favorisce la più rapida insorgenza delle neoplasie nella specie canina rispetto all'uomo, suggerendo un possibile ruolo come sentinella di particolari fattori di rischio come già dimostrato per altre tipologie di tumori. A questo proposito si ricorda che in un recente studio epide-

miologico italiano è stata riscontrata una correlazione tra incenerimento illegale di rifiuti e insorgenza di neoplasie nel cane (prevalentemente linfomi multicentrici), confermando un dato già pubblicato e certo nella medesima area geografica per l'uomo.⁸ Oltre a questo, un altro fattore ambientale considerato a rischio per l'insorgenza di linfoma è l'esposizione agli erbicidi.⁷ A conclusione dei fattori di rischio eziologico si ricorda come la soppressione del sistema immunitario possa essere responsabile dell'insorgenza di linfomi, anche se non è disponibile una forte evidenza scientifica in oncologia canina. La descrizione di un caso di linfoma insorto dopo trattamento con ciclosporina supporta una possibile correlazione tra immunosoppressione e sviluppo di linfoma.⁹

2. Esame obiettivo generale, tra cui palpazione dei linfonodi periferici, esame delle mucose, esplorazione del cavo orale, palpazione dell'addome per valutare l'eventuale organomegalia, l'ispessimento delle pareti intestinali o la linfoadenomegalia addominale, auscultazione del torace ed esame del fondo dell'occhio, che evidenzia l'eventuale infiltrazione oculare. Se è vero che l'esame obiettivo generale consente al clinico di ottenere numerose informazioni, è sempre necessario ricorrere anche ad indagini strumentali per indagare le sedi non immediatamente accessibili, spesso infiltrate.

3. Esame emocromocitometrico, ematochimica ed esame delle urine. In particolare, la valutazione dell'esame emocromocitometrico e la lettura dello striscio periferico permette di escludere la presenza di fattori prognostici negativi, tra cui anemia¹² e trombocitopenia¹³ e di identificare eventuali cellule neoplastiche circolanti. I parametri ematochimici che devono sempre essere valutati includono calcio ionico, lattato deidrogenasi (LDH), fosfatemia, kaliemia. L'ipercalcemia, spesso associata al fenotipo T, è un fattore prognostico negativo ben documentato, mentre la valutazione di calcio, potassio e fosforo identifica i soggetti più a rischio di sviluppare la sindrome da lisi tumorale in corso di chemioterapia d'induzione. La valutazione seriale di LDH al termine della chemioterapia permette di predire la recidiva, prima che questa sia clinicamente evidenziabile.¹⁴

4. La citologia per ago-infissione dei linfonodi periferici rappresenta un esame irrinunciabile, perché diagnostico nella maggioranza dei casi, facile e veloce da eseguire, scevro da effetti collaterali ed economico. In merito a quali linfonodi esaminare citologicamente, si consiglia di evitare i mandibolari, dal momento che sono esposti a numerosi antigeni presenti nel cavo orale e possono falsare il quadro, inducendo spesso una falsa diagnosi di iperplasia.



Figura 4 - Linfoma epiteliotropo in un cane. Si osservi l'eritroderma esfoliativo, tipico di questa forma.



Figura 5 - Linfoma non epiteliotropo multifocale in un cane. Si osservino le lesioni nodulari ulcerate, anche di aspetto serpiginoso (arti anteriori).

Una volta ottenuta la diagnosi citologica di linfoma, sono necessari due passaggi obbligatori e fondamentali prima dell'inclusione nei protocolli di trattamento e nella formulazione della prognosi: stadiazione clinica e stadiazione patologica.

Seppur non conclusivo nella totalità dei sottotipi, l'esame citologico permette nella maggior parte dei casi di identificare le forme di linfoma più comuni, in particolare le forme ad alto grado (linfomi aggressivi). A differenza dell'uomo, nel cane, infatti, la maggior parte dei linfomi presenta un interessamento linfonodale diffuso,

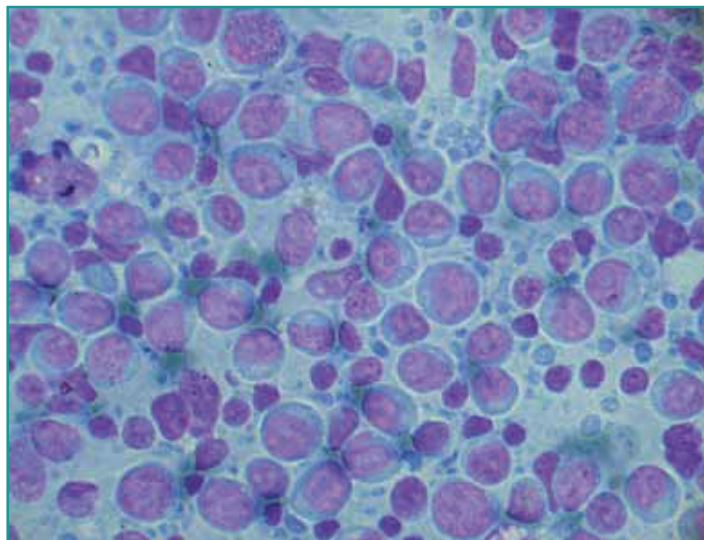


Figura 6 - Esame citologico di un linfoma a grosse cellule centroblastico pleomorfo. Sono presenti corpi linfoghiandolari. Rari piccoli linfociti residui. La citometria a flusso ha evidenziato un fenotipo B.

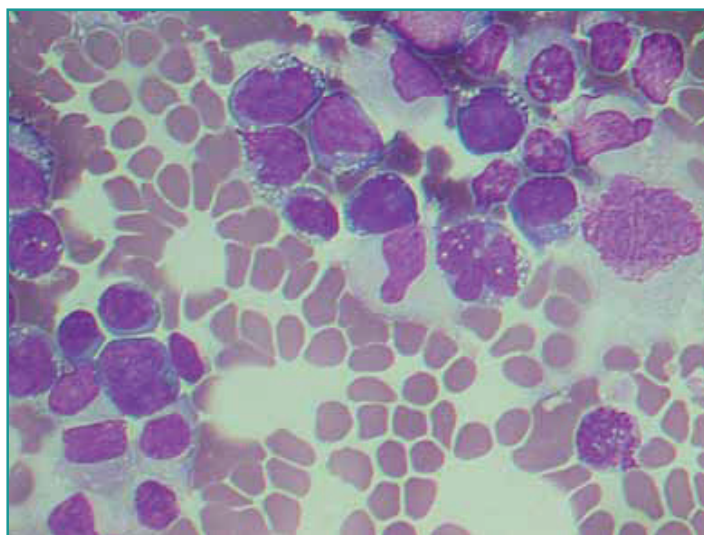


Figura 7 - Esame citologico di un linfoma a grosse cellule T, caratterizzate da nucleo inciso e scarso citoplasma microvacuolizzato. La citometria a flusso ha evidenziato un fenotipo T.

ed il prelievo citologico permette spesso di raccogliere materiale rappresentativo dell'intera popolazione neoplastica.¹⁵ L'applicazione dei criteri di valutazione citomorfologica stabiliti dalla classificazione Kiel updated permettono di identificare i sottotipi con maggior incidenza nei linfomi sia a cellule B (Figura 6) sia a cellule T (Figura 7).

5. La **determinazione dell'immunofenotipo** è fondamentale per distinguere i linfomi B dai T, diversi dal punto di vista prognostico e terapeutico. Oggi la diagnosi generica di "linfoma" è largamente insufficiente,

e la corretta identificazione del sottotipo citomorfologico ed immunofenotipico in aggiunta all'interpretazione dell'esame citologico è considerato essenziale. Un patologo clinico anche molto esperto può definire in modo non corretto il fenotipo sulla base delle sole caratteristiche morfologiche. Pertanto, è sempre richiesto il corretto inquadramento fenotipico, che può essere fatto mediante citometria a flusso su sospensioni di cellule a fresco (aspirati linfonodali, sangue periferico, sangue midollare),¹⁶ mediante immunistochemica su sezioni istologiche, e mediante immunocitochemica su preparati citologici.

L'immunofenotipizzazione si basa sul fatto che le cellule coinvolte rappresentano la controparte neoplastica di quelle normali. Pertanto, il loro quadro antigenico rispecchia la loro linea d'origine e lo stadio maturativo al quale si sono arrestate. Un fenotipo omogeneo nella popolazione in esame è inoltre indicativo di proliferazione clonale ed è quindi conferma di un processo neoplastico.

La citometria a flusso, se accoppiata all'esame citologico, è indubbiamente la tecnica maggiormente sensibile nell'identificare le cellule neoplastiche, anche quando presenti in percentuale limitata, poiché identifica le sottopopolazioni leucocitarie in base alle loro caratteristiche morfologiche e all'espressione qualitativa e quantitativa di diversi antigeni.

Tra tutte le tecniche che consentono di definire il fenotipo delle cellule neoplastiche, sicuramente la citometria a flusso ha trovato ampia diffusione in medicina veterinaria, poiché oltre ad identificare le caratteristiche fisiche e immunologiche dei linfociti presenti nel campione da analizzare, permette anche di quantificare le sottopopolazioni presenti.

L'immunofenotipizzazione prevede l'uso di anticorpi monoclonali specifici per identificare markers leucocitari espressi in maniera diversa nelle singole popolazioni linfocitarie. Trattamenti precedenti con glicocorticoidi mascherano l'assetto antigenico di superficie, rendendo difficoltoso il riconoscimento dell'immunofenotipo.

I pannelli anticorpali utilizzati nel cane comprendono generalmente: marker panleucocitari (CD18, CD45, CD44), principali marker linfoidi T (CD3, CD5, CD4, CD8) e B (CD21, CD79a, IgM, IgG). È possibile identificare anche il marker CD34, antigene presente sui precursori ematopoietici, tipicamente espresso nelle forme di leucemie acute, ma la cui espressione aberrante è possibile anche nei linfomi.¹⁷

6. Per dare “nome e cognome” al linfoma si deve ricorrere all'**istologia** ed **immunoistochimica**. La diagnosi di “linfoma” non descrive, infatti, una singola patologia specifica, ma un insieme molto eterogeneo di entità diverse, sia per presentazione clinica, sia per aspetti clinico-patologici e patologici e, di conseguenza, anche prognosi e terapia sono eterogenee nel cane.^{18,19} Negli anni, gruppi internazionali hanno proposto diversi modelli classificativi per il linfoma del cane e il più delle volte l'analogia con i linfomi non-Hodgkin dell'uomo ha portato ad un adattamento dei sistemi classificativi della medicina umana. Ad oggi, il sistema di classificazione della World Health Organization (WHO) è considerato il gold standard per la caratterizzazione istomorfológica.²⁰

Se in passato i linfomi venivano raggruppati tutti come unica entità, la letteratura degli ultimi 20 anni dimostra che, a parità di stadio clinico e fenotipo, la risposta alla terapia e quindi la prognosi variano considerevolmente, impedendo anche confronti utili tra i vari protocolli terapeutici proposti (manoscritto in preparazione). Ciò ha portato a richiedere l'esame istologico, unica analisi capace di distinguere i vari istotipi, molto diversi in termini di comportamento biologico. Basti pensare al linfoma diffuso B a grandi cellule (DLBCL: “Diffuse Large B-Cell Lymphoma”) e al linfoma di Burkitt, indistinguibili da un punto di vista citologico e fenotipico, ma molto diversi in termini di risposta alla terapia. Il linfoma di Burkitt, infatti, ha inesorabilmente prognosi infausta nonostante la polichemioterapia, al contrario del DLBCL.

Quindi, per ottenere una diagnosi definitiva, ma soprattutto per differenziare i linfomi diffusi (aggressivi) da quelli follicolari (indolenti), è necessario asportare e valutare un intero linfonodo periferico. I linfomi di basso grado o indolenti, infatti, presentano una crescita focale, che è possibile definire solo attraverso l'istologia del linfonodo completo. È pertanto sconsigliato il prelievo mediante tru-cut, perché riduce la possibilità di definire l'estensione della lesione.

L'architettura del linfonodo in toto è fondamentale nella distinzione del tipo di crescita del linfoma, follicolare o diffusa. Questa prima distinzione permette di differenziare forme di linfoma con diverso carattere prognostico e terapeutico (linfomi aggressivi e linfomi indolenti).

Oltre al pattern di crescita, esistono altri parametri che permettono di inquadrare il tipo di linfoma: dimensioni del nucleo delle cellule neoplastiche, distribuzione della cromatina e dei nucleoli, volume del citoplasma ed

eventuale presenza di granuli o vacuoli, indice mitotico, e presenza/assenza di macrofagi attivati.²⁰

L'immunoistochimica è fondamentale per differenziare i linfomi ad immunofenotipo B e T. Nel cane sono disponibili e utilizzati di routine anticorpi su paraffinato diretti contro cellule di tipo B: CD79 (espresso da tutta la linea B), CD20 (espresso sulla membrana di linfociti B, rari linfociti T, assente nelle plasmacellule), PAX-5 (fattore di trascrizione per il mantenimento della linea B) e MUM-1 (fattore di trascrizione per le plasmacellule). Anticorpi diretti contro cellule T sono: CD3 e CD5. È possibile analizzare l'espressione di Ki-67 per determinare la frazione di crescita cellulare.²¹

7. Per la maggior parte delle proliferazioni linfoidi, la valutazione morfologica e fenotipica sono sufficienti per emettere diagnosi. In una piccola percentuale di casi, invece, è necessario ricorrere a tecniche di biologia molecolare (**PARR**: “PCR for antigen receptor rearrangement”), come, ad esempio, in alcune forme di

L'utilizzo della PARR è significativo nel differenziare alcune forme di linfoma che, sia citologicamente sia istologicamente, presentano caratteristiche non identificative di un sottotipo specifico. La PARR è stata anche proposta per valutare la malattia minima residua.

linfoma che, sia citologicamente sia istologicamente, presentano caratteristiche non identificative di un sottotipo specifico. Amplificando le sequenze di DNA codificanti per TCR o BCR nella popolazione linfocitica, si valuta lo stato di riarrangiamento di questi recettori. Se la popolazione linfocitica è policlonale (ad esempio, iperplasia linfoide), l'amplificazione mediante PCR produrrà ampliconi di varie dimensioni. Al contrario, in caso di linfoma, l'amplificazione produce ampliconi della medesima dimensione, ad indicare la presenza di una popolazione monoclonale. I risultati della PARR devono sempre essere correlati con dati clinici, morfologici, immunofenotipici e laboratoristici, e mai essere considerati isolatamente. La PARR può essere condotta su materiale fissato e su aspirati citologici, ed è utile per determinare il fenotipo, per valutare l'infiltrazione neoplastica di sangue e midollo e per identificare la malattia minima residua.²²⁻²⁵

8. L'esame del **midollo osseo** rappresenta una tappa fondamentale e irrinunciabile nella stadiazione dei cani con linfoma, non solo ai fini prognostici ma anche terapeutici.²⁶ Il prelievo per aspirazione di solito è sufficiente per emettere diagnosi, poiché è possibile fare una valutazione morfologica e anche citometrica (Video 1).



Video 1 - Prelievo di midollo osseo dall'ala dell'ileo in un cane con linfoma durante lo staging iniziale. Il prelievo viene fatto con l'animale sveglio in anestesia locale.
<http://cms.scivac.it/it/v/12207/1>

La citometria a flusso su sangue midollare determina l'infiltrazione di cellule linfomatose anche in percentuali molto ridotte (< 1%). Trattandosi di un esame poco invasivo ma dal fondamentale significato prognostico, dovrebbe sempre essere incluso nello staging iniziale dei cani con linfoma.

In particolare, la citometria a flusso consente di determinare l'infiltrazione di cellule linfomatose anche in percentuali molto ridotte (<1%) e di differenziare tra linfomi con infiltrazione midollare (CD34-) e leucemie linfoblastiche acute (CD34+). Sono state tuttavia segnalate aberrazioni, pertanto anche in questo caso i dati devono essere valutati in concerto e non singolarmente.¹⁷ Recentemente è stato documentato come l'infiltrazione del sangue periferico non correla con la presenza/ assenza di cellule neoplastiche nel midollo osseo, pertanto queste due indagini sono entrambe fondamentali e non mutualmente esclusive.²⁷ Infine, è stato definito per i linfomi B ad alto grado del cane un cut-off prognostico citometrico di infiltrazione midollare. Cani con un cut-off di infiltrazione midollare inferiore a 3% avevano un tempo alla progressione e una sopravvivenza significativamente più lunghi di cani con infiltrazione midollare > 3%.²⁸

9. La **diagnostica per immagini** completa lo staging dei cani con linfoma, e prevede lo studio radiografico del torace nelle 3 proiezioni, l'ecografia dell'addome, e la valutazione citologica di milza e fegato, anche se ecograficamente non alterati.^{29,30} In particolare, l'esame diretto (citologia) consente di confermare l'infiltrazione viscerale da parte delle cellule neoplastiche, ma anche di identificare altre cause alla base di eventuali alterazioni ecografiche.²⁹

La tomografia computerizzata, l'endoscopia con biopsie multiple e la scintigrafia ossea possono essere proposte ed eseguite in alcuni casi selezionati. La PET è

La diagnostica per immagini conclude la stadiazione e permette di indagare il torace e l'addome. Non sempre le forme debuttanti di linfoma si evidenziano con alterazioni radiografiche e/o ecografiche, pertanto è utile l'esame diretto dei visceri mediante valutazione citologica.

stata recentemente proposta per monitorare la risposta alla chemioterapia e diagnosticare una recidiva precoce, consentendo quindi di intervenire con protocolli chemioterapici di salvataggio prima che il linfoma sia di nuovo clinicamente apparente.^{31,32} Si tratta di studi ancora preliminari, soprattutto considerando la scarsa disponibilità di PET per la medicina veterinaria in Europa.

STADIAZIONE CLINICA SECONDO WHO

Il sistema WHO suddivide il linfoma in base alla forma anatomica e raggruppa i cani secondo la distribuzione di coinvolgimento linfonodale (stadio I-III), epatico e/o splenico (stadio IV) e midollare, ematico e/o di altri organi (stadio V).

La stadiazione clinica proposta è la seguente:

Stadio I: interessamento limitato a singolo linfonodo o tessuto linfoide di singolo organo (incluso mediastino craniale).

Stadio II: interessamento regionale di più linfonodi, con o senza coinvolgimento tonsillare.

La stadiazione dei linfomi del cane segue lo schema WHO, che prevede 5 stadi secondo l'estensione del coinvolgimento neoplastico. Tale sistema classificativo ha significato prognostico nei linfomi aggressivi, mentre perde valore nei linfomi indolenti, tipicamente diagnosticati in stadio molto avanzato.

Stadio III: interessamento linfonodale generalizzato.

Stadio IV: interessamento di fegato e/o milza, con o senza coinvolgimento generalizzato di linfonodi (stadio I-III).

Stadio V: interessamento midollare, ematico e/o di altri organi extranodali (tratto gastroenterico, cute, reni, polmoni con o senza versamento pleurico, solo versamento pleurico se non è secondario a linfoadenopatia, occhio, pericardio, midollo spinale), con o senza gli altri stadi.

Ogni stadio deve essere ulteriormente caratterizzato dalle lettere *a* o *b*, che indicano, rispettivamente, assenza o presenza di sintomi sistemici. La presenza di ipercalcemia fa rientrare il paziente in sottostadio *b*.

Nella maggior parte dei pazienti il linfoma è diagnosticato in stadio III o IV.

Mentre i linfomi aggressivi possono essere diagnosticati anche precocemente, i linfomi indolenti sono quasi ine-

vitabilmente diagnosticati in stadio avanzato, quando compaiono i sintomi, e soltanto una quota minoritaria è in stadio I-III. L'infiltrazione midollare è comune, così come la leucemizzazione: l'esame citofluorimetrico del sangue periferico e midollare è in grado di evidenziare la presenza di elementi neoplastici clonali in > 80% dei linfomi indolenti nodali, ma non in quelli marginali splenici, che pertanto possono essere guariti con la sola splenectomia.¹⁹ La forte prevalenza di stadi avanzati riduce naturalmente il valore prognostico del tradizionale sistema classificativo WHO, che pur rimane ancora il sistema di riferimento per la stadiazione dei linfomi indolenti del cane.

Valutazione di risposta alla terapia: end-staging

La risposta alla terapia viene valutata ripetendo tutte le indagini che nello staging iniziale avevano dato risultati anomali, per accertare lo stato di remissione e definire se è indicata l'interruzione della terapia, l'istituzione di un protocollo di mantenimento oppure di consolidamento, anche in virtù dell'istotipo.

La palpazione di linfonodi periferici è soggettiva e quindi non attendibile per valutare lo stato di remissione del cane, pertanto è sempre meglio ricorrere alla valutazione citologica.

Storicamente, la risposta alla terapia è stata valutata secondo le linee guida WHO:

Remissione completa (CR): regressione completa di tutti i segni e sintomi di neoplasia, per la durata minima di 4 settimane.

Remissione parziale (PR): regressione 50% nella somma del prodotto dei due diametri perpendicolari principali di tutte le lesioni misurabili, per la durata minima di 4 settimane.

Malattia stabile (SD): regressione del 25-50% nel prodotto dei due diametri perpendicolari principali di tutte le lesioni misurabili.

Progressione (PD): aumento 25% rispetto alla misurazione iniziale del prodotto dei due diametri perpendicolari principali di tutte le lesioni misurabili (a prescindere dalla possibile contemporanea regressione in altre sedi tumorali), oppure comparsa di nuove lesioni.

Ricaduta: comparsa di nuove lesioni, oppure aumento del 50% rispetto ai valori pre-terapeutici nel prodotto dei due diametri perpendicolari principali di tutte le lesioni misurabili dopo un periodo di CR o PR.

Ma come si valuta come un linfoma ha risposto alla terapia? Quali esami devono essere ripetuti?

Secondo un *consensus document* recente, è necessario che gli esami volti allo staging e re-staging dei cani con linfoma

siano “realistici, riproducibili e facilmente applicabili”.³³ Tali linee guida devono essere applicate unicamente ai cani con linfoma multicentrico, in cui la linfadenomegalia periferica rappresenta la componente principale della malattia. Tale documento non è da intendersi come permanente ma, al contrario, in evoluzione.

Le linee guida si avvalgono del sistema RECIST (“Response Evaluation Criteria In Solid Tumors”, applicato in oncologia umana)³⁴, che consente di dividere la malattia in misurabile e non misurabile. Tutte le lesioni misurabili, fino ad un massimo di 5 lesioni per organo e 10 lesioni complessive, devono essere selezionate in base alla loro dimensione ed alla possibilità di ottenere misure ripetute nel tempo. La semplificazione proposta dai criteri RECIST consiste nella monodimensionalità della misurazione; infatti, si calcola la somma dei diametri maggiori delle lesioni considerate (LD: “Longest Diameter”) a differenza dei criteri WHO che considerano il prodotto di LD per il diametro maggiore ad esso perpendicolare.

La malattia non misurabile viene indicata come presente/assente e va applicata a lesioni molto piccole, lesioni ossee, versamento pleuro/pericardio, masse tumorali addominali non quantificabili (ad es., splenomegalia) con le metodiche convenzionali. Dopo un follow-up di 4-8 settimane dall'inizio del trattamento, utilizzando i criteri RECIST, si definisce risposta completa (CR) la scomparsa di tutte le lesioni bersaglio, risposta parziale (PR) la riduzione di almeno 30% della somma di LD valutata in basale (con i criteri WHO riduzione di almeno 50%), progressione di malattia (PD) l'incremento di almeno 20% della somma di LD o la comparsa di nuove lesioni, malattia stabile (SD) le modificazioni della somma di LD che non soddisfano i criteri di PR e PD.

Secondo questo *consensus document*,³³ la valutazione di risposta alla terapia prevede la misurazione dei linfonodi periferici.

La possibilità di identificare precocemente l'attiva presenza di tessuto neoplastico consente di intervenire con protocolli di salvataggio prima che il linfoma sia di nuovo clinicamente apparente. Pertanto la valutazione di MRD nel linfoma aggressivo risulta particolarmente utile nel contesto di nuove strategie terapeutiche finalizzate all'eradicazione della malattia.

Tuttavia, appare ovvio che la sola misurazione dei linfonodi periferici per la valutazione della risposta alla terapia presenta dei grossi limiti, in particolare a causa dell'impossibilità di dimostrare la presenza di malattia minima residua (MRD) nei linfonodi, ma anche nel sangue e nel midollo osseo. MRD rappresenta il tessuto

neoplastico attivo, che darà origine alla recidiva clinicamente evidenziabile.

In linea con l'oncologia umana, anche in medicina veterinaria si stanno facendo progressi nella valutazione di MRD, volta a differenziare casi reali di remissione completa da casi apparenti (cani in remissione clinica completa ma con malattia residua a livello cellulare) e dettare quindi le successive scelte terapeutiche.^{24,25} In uno studio recente che confrontava istologia, citometria a flusso e PARR per l'identificazione di MRD in cani con linfoma DLBCL sottoposti a trattamento, circa l'80% dei pazienti aveva MRD positiva in PARR nonostante la remissione clinica.²⁵

È importante tuttavia sottolineare che ad oggi non è ancora del tutto definito nei linfomi DLBCL il ruolo predittivo della PARR nell'anticipare precocemente una recidiva e la necessità di istituire immediatamente un protocollo di salvataggio, di conseguenza le decisioni terapeutiche dovrebbero basarsi sulla valutazione comparativa dei risultati dell'esame PARR integrati con elementi clinici ed altre indagini strumentali, compreso il prelievo citologico (ed eventualmente fluorimetrico) delle sedi sospette per persistenza di malattia. Mentre l'eradicazione di MRD è un

obiettivo raggiungibile in corso di linfomi aggressivi a fenotipo B, questa è improbabile in quelli a fenotipo T e irrealizzabile nei linfomi indolenti. Questi ultimi, infatti, sono considerati incurabili poiché contraddistinti da continui pattern di recidiva dopo terapia convenzionale. La strategia terapeutica per i linfomi indolenti è ancora oggetto di notevoli controversie, e deve tenere conto della natura indolente della malattia e del rischio di recidive che rende quasi certo il ricorso nel tempo a successive linee di terapia per ottenere un buon controllo della malattia.³⁵ La presenza di MRD nei linfomi B e T aggressivi depone a favore di un protocollo di consolidamento/mantenimento, mentre l'eventuale implicazione terapeutica non è ancora chiara nei linfomi indolenti.

CONCLUSIONI

Il linfoma del cane può essere facilmente stadiato, sia in prima presentazione, sia dopo trattamento, per verificare il risultato antitumorale ottenuto e valutare l'opportunità di interrompere la terapia o istituire un protocollo di mantenimento o consolidamento.

PUNTI CHIAVE

- La stadiazione iniziale definisce quanto è esteso il linfoma al momento della diagnosi.
- Lo stadio clinico rappresenta, insieme all'istotipo, il metodo con cui si definisce la prognosi e si sceglie la terapia più adatta.
- La stadiazione finale prevede la esecuzione di tutti gli esami che inizialmente avevano dato un risultato alterato.
- La stadiazione finale ricerca la malattia minima residua e permette di valutare la risposta al trattamento eseguito.

Initial and end-staging of canine lymphoma: the essential in short and to everyone

Lymphoma represents one of the most common cancer in the canine species. In recent years, considerable progress has been made in treating canine lymphoma, resulting in the urge of a correct staging work-up at initial presentation but also at the end of treatment. This review focuses on the initial staging of canine lymphoma, aimed at defining prognosis and driving treatment, and on the end-staging for the assessment of treatment response.

REFERENZE

1. Marconato L. The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: a review of recent developments and future prospects. *The Veterinary Journal* 188:34-38, 2011.
2. Richards KL, Motsinger-Reif AA, Chen HW, *et al.* Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and postgerminal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL. *Cancer Research* 73:5029-5039, 2013.
3. Elvers I, Turner-Maier J, Swofford R, *et al.* Exome sequencing of lymphomas from three dog breeds reveals somatic mutation patterns reflecting genetic background. *Genome Research* 2015 Sep 16. pii: gr.194449.115. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26377837.
4. Frantz AM, Sarver AL, Ito D, *et al.* Molecular profiling reveals prognostically significant subtypes of canine lymphoma. *Veterinary Pathology* 50:693-703, 2013.
5. Breen M, Modiano JF. Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans—man and his best friend share more than companionship. *Chromosome Research* 16:145-154, 2008.

6. Haesebrouck F, Pasmans F, Flahou B, *et al.* Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clinical Microbiology Reviews* 22:202-223, 2009.
7. Gavazza A, Presciuttini S, Barale R, *et al.* Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15:190-195, 2001.
8. Marconato L, Leo C, Girelli R, *et al.* Association between waste management and cancer in companion animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:564-569, 2009.
9. Blackwood L, German AJ, Stell AJ, O'Neill T. Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. *Journal of Small Animal Practice* 45:259-262, 2004.
10. 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* 43:313-321, 2007.
11. Van den Steen N, Berlato D, Polton G, *et al.* Rectal lymphoma in 11 dogs: a retrospective study. *Journal of Small Animal Practice* 53:586-591, 2012.
12. Miller AG, Morley PS, Rao S, *et al.* Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:116-122, 2009.
13. Garrett LD, Thamm DH, Chun R, *et al.* Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16:704-709, 2002.
14. Marconato L, Crispino G, Finotello R, *et al.* Clinical relevance of serial determinations of lactate dehydrogenase activity used to predict recurrence in dogs with lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 236:969-974, 2010.
15. Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, *et al.* Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Comparative Pathology* 117:35-59, 1997.
16. Comazzi S, Gelain ME. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *The Veterinary Journal* 188:149-155, 2011.
17. Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F, *et al.* Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 121:179-188, 2008.
18. Valli VE, Kass PH, Myint MS, Scott F. Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. *Veterinary Pathology* 50:738-748, 2013.
19. Aresu L, Martini V, Rossi F, *et al.* Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation. *Veterinary & Comparative Oncology* 2013 Jun 20. doi: 10.1111/vco.12048. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23782432.
20. Valli VE, San Myint M, Barthel A, *et al.* Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Veterinary Pathology* 48:198-211, 2011.
21. Poggi A, Miniscalco B, Morello E, *et al.* Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. *Veterinary & Comparative Oncology* 2013 Dec 17. doi: 10.1111/vco.12078.
22. Lana SE, Jackson TL, Burnett RC, *et al.* Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20:329-334, 2006.
23. Thalheim L, Williams LE, Borst LB, Fogle JE, Suter SE. Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27:1509-1516, 2013.
24. Gentilini F, Turba ME, Forni M. Retrospective monitoring of minimal residual disease using hairpin-shaped clone specific primers in B-cell lymphoma affected dogs. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 153:279-288, 2013.
25. Aresu L, Arico A, Ferrareso S, *et al.* Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. *The Veterinary Journal* 200: 318-324, 2014.
26. Marconato L, Bonfanti U, Stefanello D, *et al.* Cytosine arabinoside in addition to VCAA-based protocols for the treatment of canine lymphoma with bone marrow involvement: does it make the difference? *Veterinary & Comparative Oncology* 6:80-89, 2008.
27. Martini V, Melzi E, Comazzi S, Gelain ME. Peripheral blood abnormalities and bone marrow infiltration in canine large B-cell lymphoma: is there a link? *Veterinary & Comparative Oncology* 13:117-123, 2015.
28. Marconato L, Martini V, Aresu L, *et al.* Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: prognostic significance and proposal of a cut-off value. *The Veterinary Journal* 197:776-781, 2013.
29. Crabtree AC, Spangler E, Beard D, Smith A. Diagnostic accuracy of gray-scale ultrasonography for the detection of hepatic and splenic lymphoma in dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 51:661-664, 2010.
30. Nerschbach V, Eberle N, Joetzke AE, *et al.* Splenic and hepatic ultrasound and cytology in canine lymphoma: effects of findings on stage migration and assessment of prognosis. *Veterinary & Comparative Oncology* 2014 Dec 3. doi: 10.1111/vco.12127. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25470748.
31. Lawrence J, Vanderhoek M, Barbee D, *et al.* Use of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine PET/CT for evaluating response to cytotoxic chemotherapy in dogs with non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Radiol Ultrasound*. 2009; 50:660-8.
32. LeBlanc AK, Jakoby BW, Townsend DW, Daniel GB. 18FDG-PET imaging in canine lymphoma and cutaneous mast cell tumor. *Vet Radiol Ultrasound*. 2009; 50:215-23.
33. Vail DM, Michels GM, Khanna C, *et al.* Veterinary Cooperative Oncology Group. Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0)—a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol*. 2010;8:28-37.
34. Nguyen SM, Thamm DH, Vail DM, London CA. Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol*. 2015;13:176-83.
35. Young RC, Longo DL, Glatstein E, *et al.* The treatment of indolent lymphomas: watchful waiting versus aggressive combined modality treatment. *Semin Hematol*. 1988; 25(2 Suppl 2):11-6.