

*Ogni ricerca a volte porta dei risultati
a volte lascia dei dubbi,
ma molto spesso apre la mente
a nuove ricerche*



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA
DIPARTIMENTO DI SALUTE ANIMALE
Sezione di Patologia Generale e di Anatomia Patologica Veterinaria

DOTTORATO DI RICERCA IN
IMMUNOLOGIA, IMMUNOPATOLOGIA SPERIMENTALE E
COMPARATA

XXIV ciclo

Chemioterapia: Cardiotossicità ed Immunosoppressione

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. Attilio Corradi

TUTOR:

Chiar.mo Dott.ssa Benedetta Passeri

CORRELATORI: Chiar.mo Prof. Ubaldi Antonio

Chiar.mo Dott.ssa Vescovini Rosanna

DOTTORANDA: *Dott.ssa Muzzoni Elena*

INDICE

Riassunto.....	pag. 4
Summary.....	pag. 7
1. INTRODUZIONE.....	pag.10
1.1 Troponina I Cardiaca.....	pag. 15
1.2 Cenni di Citometria a Flusso.....	pag. 18
2. MATERIALI E METODI.....	pag. 21
2.1 Criteri di Inclusione: cani.....	pag. 21
2.2 Campionamento.....	pag.27
2.3 ACCESS Immunoassay System ACCU TnI.....	pag. 29
2.4 Valutazione Citofluorimetrica.....	pag. 30
- Antigeni di Superficie: metodica.....	pag. 32
- Antigeni Intracitoplasmatici: metodica.....	pag. 33
- Analisi Citofluorimetrica.....	pag. 34
3. TRATTAMENTO DATI.....	pag. 35
3.1 Analisi Statistica.....	pag. 44
3.2 Risultati.....	pag. 44
4. DISCUSSIONE.....	pag. 51
Ringraziamenti.....	pag. 58
APPENDICE 1: <i>Esame Emocromocitometrico</i>	pag. 59
APPENDICE 2: <i>Sottopopolazioni Linfocitarie</i>	pag.68
Bibliografia.....	pag. 78

RIASSUNTO

La cardiotossicità e la mielosoppressione sono due tra gli effetti collaterali di alcuni agenti chemioterapici che più ne limitano l'utilizzo. Sia in Medicina Umana, sia in Medicina Veterinaria questi effetti secondari, hanno un forte impatto sulla qualità di vita e sulla sopravvivenza stessa del paziente, indipendentemente dal problema oncologico di base. La necessità di identificare precocemente i pazienti a più alto rischio di cardiotossicità ed una eventuale mielosoppressione conseguente al protocollo chemioterapico seguito, diventa un'esigenza molto importante che può portare all'aggiustamento o alla sospensione della terapia oncologica con successivo trattamento cardiologico e/o immuno - modulatore adiuvante.

Il primo obiettivo di questo studio è quello di identificare i farmaci implicati nella cardiotossicità chemioterapica - indotta, al fine di evidenziare precocemente un eventuale danno cardiaco, tramite esami di laboratorio poco invasivi, sensibili, specifici e facilmente ripetibili. Viene quindi proposto, in questo studio, l'utilizzo del dosaggio della Troponina I Cardiaca, quale indicatore di danno cardiaco. La metodica utilizzata è la stessa applicata in medicina umana ossia si basa sull'Immunodosaggio in Chemiluminescenza con particelle paramagnetiche, metodo ACCESS ACCU TnI™ sul sistema UNICELL DXL 800.

Il secondo obiettivo è quello di evidenziare gli effetti che alcuni agenti chemioterapici possono avere sul sistema immunitario, ricercando eventuali variazioni nelle sottopopolazioni linfocitarie con l'utilizzo della citometria a flusso, utilizzando il seguente panel anticorpale: CD3, CD4, CD8 e CD21.

E' stato prelevato il sangue da 34 cani suddivisi in due gruppi: n. 10 cani clinicamente sani (gruppo di controllo) e n. 24 cani con tumore.

Dei 24 casi di cani con tumore (1 osteosarcoma, 13 linfomi, 1 emangiosarcoma, 1 adenocarcinoma dei sacchi anali, 2 leucemie linfocitiche, 1 carcinoma vescicale ed 1 tumore cerebrale), solo in 14 casi si è potuto seguire l'andamento della cTnI e delle sottopopolazioni linfocitarie prima e durante la chemioterapia; con prelievi a distanza di 24 h dalla somministrazione del chemioterapico, durante l'intero ciclo di terapia. Negli altri 10 casi, non è stata effettuata nessun tipo di terapia oncologica per le già critiche condizioni di salute del paziente o per mancato consenso da parte del proprietario. In un caso è stato possibile seguire solo l'andamento della Troponina I Cardiac (cTnI) a causa di insufficiente campione per la marcatura citofluorimetrica (caso n. 24).

I 14 cani sottoposti a chemioterapia, sono stati divisi in 3 gruppi in base al protocollo chemioterapico utilizzato: Doxorubicina da sola o in associazione (gruppo 1, n.5 casi), Sali del Platino (gruppo 2, n. 5 casi) e Clorambucile (gruppo 3, n. 3 casi). E' stato valutato anche un singolo caso trattato con Temozolomide, per il solo dosaggio della cTnI.

I dati ottenuti dal dosaggio della cTnI e dalla marcatura delle sottopopolazioni linfocitarie nei controllo sani, ricalcano i dati presenti in bibliografia. Dal confronto dei due tempi (T0 – T1), per le sottopopolazioni linfocitarie, si è potuto osservare un calo significativo ($P < 0,05$), dei globuli bianchi totali e dei linfociti totali, sia nel gruppo 1 (Doxorubicina) sia nel gruppo 2 (Sali del Platino), ma non nel gruppo 3 (Clorambucile). Nel gruppo 1 (Doxorubicina), il calo era statisticamente significativo per le sole sottopopolazioni CD21+ (linfociti B), mentre nel gruppo 2 riguardava le sottopopolazioni CD3+ (linfociti T), con calo significativo dei soli linfociti CD4+ (T – Helper).

La troponina I Cardiaca, ha mostrato aumenti in 3 casi su 5 del gruppo 1 (Doxorubicina) e del gruppo 2 (Sali del Platino), ma non nel gruppo 3 (Clorambucile). Gli aumenti sono stati più rapidi nel gruppo 2 (Sali del Platino).

Parole chiave: *Cardiotossicità, Immunosoppressione, Citometria a Flusso, Troponina I Cardiaca , Anticorpi.*

SUMMARY

Cardiotoxicity and Myelosuppression are among two of the side effects of some Chemotherapy agents mostly limiting their use.

Both in human and veterinary medicine, these side effects do have a strong impact on both the patient's life quality and his survival, irrespective of the basic oncologic problem.

The need to determine highest cardiotoxicity risk patients in advance and a possible myelosuppression due to the chemotherapy protocol followed, becomes a crucial factor that can bring either to the adjustment or to the suspension of the Oncology therapy, followed by a cardiologic and/or an immunostimulatory help.

The first aim of this study is to identify medicines involved into chemotherapy-induced cardiotoxicity, in order to determine a possible cardiac damage in advance by means of minimally invasive, sensitive, specific and easily repeatable laboratory tests.

In this study we therefore suggest to use Cardiac Troponin I as an indicator for cardiac damage. The method used is the same applied in human medicine, which means it's based on Immulite Troponin I immunometric chemiluminescent assay system, method ACCES ACCU TnItim on UNICELL DXL 800 system.

The second aim is to highlight the effects that some Chemotherapy agents might have on the immune system, by looking for any variations in lymphocytes subpopulations of peripheral blood by means of Flow Cytometry and of the following panels of monoclonal antibodies: CD3, CD4, CD8 and CD21.

A blood sample was taken from 34 dogs divided into two groups: n° 10 clinically healthy dogs (control group) and 24 dogs with cancer.

Only in 14 cases out of the 24 dogs with cancer (1 osteosarcoma, 13 lymphomas, 1 hemangiosarcoma, 1 apocrine gland adenocarcinoma, 2 cases of lymphocytic

leukemias, 1 bladder carcinoma and 1 cerebral tumor) we were able to follow up the pattern of cTnI and of lymphocytes subpopulations both before and during the treatment with Chemotherapy, blood sampling the subjects, 24 hours after agent chemotherapy administration the complete therapy cycle. In 10 cases no cancer treatment was made, due to the already critical patient's health conditions or to the animal's owner not giving his consent.

In 1 case we were able to follow up just the pattern of Cardiac Troponin I (cTnI), due to insufficient sample for the Flow Cytometry (case n° 24).

The 14 dogs treated with Chemotherapy were divided into 3 groups according to the Chemotherapy protocol followed: Doxorubicin alone or in association with other substances (group 1, n° 5 cases), Platinum Complexes (group 2, n° 5 cases) and Chlorambucil (group 3, n° 3 cases).

We also made evaluations on a single case treated with Temozolomide, only for the dosage of cTnI.

Data obtained from the dosage of cTnI and of lymphocytes subpopulations of healthy control groups reflect bibliographic data.

By comparing the two times (T0-T1) for lymphocytes subpopulations, we could observe a significant decrease ($P < 0,05$) in the total number of white blood cells and total lymphocytes, both in group 1 (treated with Doxorubicin) and in group 2 (treated with Platinum Complexes) but not in group 3 (treated with Chlorambucil).

In group 1 (Doxorubicin) the decrease was statistically significant just for the CD21+ (lymphocytes B) subpopulations, whereas in group 2 it involved CD3+ (lymphocytes T) subpopulations, with a significant decrease of just CD4+ (T-Helper) lymphocytes. Cardiac Troponin I showed an increase in 3 cases out of 5 in group 1 (Doxorubicin)

and in group 2 (Platinum Complexes), but not in group 3 (Chlorambucil). The increases were more rapid in group 2 (Platinum Complexes).

Key Words: *Cardiotoxicity, Myelosuppression, Flow Cytometry, Cardiac Troponin I, Antibodies*

1. INTRODUZIONE

È noto come i chemioterapici possano avere, oltre alle loro proprietà antitumorali, effetti collaterali anche gravi sull'organismo che ne possono condizionare l'utilizzo; tra i più noti ritroviamo la cardiotossicità e l'immunosoppressione.

La **cardiotossicità** rappresenta sicuramente uno dei fattori più limitanti per l'uso dei chemioterapici con un forte impatto non solo sulla qualità di vita, ma anche sulla sopravvivenza stessa del paziente indipendentemente dal problema oncologico di base (Shan K et al., 1996; Pai VB et al., 2000; Gharib MI et Al., 2002).

Studi effettuati in campo umano, hanno evidenziato come la cardiotossicità sia associata a vari agenti chemioterapici, quali: doxorubicina ed altre antracicline, composti del platino, vinblastina e bleomicina (Silber JH et al. 2004; Van den Belt - Dusebout AW et Al. 2006; Cardinale D., Sandri M T, 2004). Più della metà dei pazienti trattati in campo umano con antracicline, la classe di chemioterapici più frequentemente utilizzata e di cui è ben noto il potenziale effetto cardiotossico, valutati anche dopo 10-20 anni dalla diagnosi oncologica di iniziale, presentano alterazioni cardiache di diversa entità e vanno incontro a scompenso cardiaco conclamato o a fenomeni aritmici, rispettivamente nel 5% e nel 40% dei casi (Silber JH et al. 2004).

In campo veterinario, i chemioterapici potenzialmente cardiotossici individuati fino ad ora sono doxorubicina e daunorubicina, mentre gli analoghi più recenti (epirubicina, idarubicina) e la doxorubicina incapsulata in liposomi sono meno cardiolesivi (Marconato et al., 2005). Con la crescente attenzione dei proprietari verso i loro animali, anche in campo oncologico veterinario si stanno introducendo nuovi agenti antitumorali usati in passato solo in medicina umana; è quindi possibile scoprire effetti tossici a livello cardiaco anche con l'utilizzo di altri tipi di agenti

chemioterapici diversi dalle antracicline, così come succede nell'uomo con i derivati dei Sali del Platino (Van den Belt - Dusebout AW et Al. 2006).

La tossicità cardiaca può essere acuta e manifestarsi subito dopo la somministrazione, oppure cronica (Marconato et al., 2005; Pai VB et al. 2000; Gharib MI et al. 2002).

La tossicità acuta è caratterizzata da aritmie transitorie, che si manifestano durante la somministrazione del farmaco, non precludendone l'uso successivo (Marconato et al., 2005; Pai VB et al. 2000; Gharib MI et al. 2002). La tossicità cronica compare dopo alcune settimane fino a diversi anni dopo la fine del protocollo chemioterapico (Pai VB et al. 2000; Gharib MI et al. 2002). Nel cane la tossicità cardiaca legata alla somministrazione cumulativa di doxorubicina è causata dall'accumulo di radicali liberi che danneggiano il miocardio, portando allo sviluppo di miocardiopatia dilatativa con grave insufficienza cardiaca congestizia refrattaria ai trattamenti abituali (Adams R., 1999; Marconato L. et al., 2005). Tale danno risulta irreversibile, impedendo qualsiasi trattamento aggiuntivo, riducendo la qualità di vita e la sopravvivenza dell'animale (Marconato L. et al, 2005; Adams R., 1999). Da qui l'esigenza di identificare precocemente i pazienti a più alto rischio di cardiotossicità, per i quali possa essere indicato un monitoraggio cardiologico più stretto con l'aggiustamento o la sospensione completa del trattamento oncologico. La miglior strategia terapeutica, sia in medicina umana sia in medicina veterinaria, resta comunque la prevenzione e la diagnosi precoce (Marconato L. et al, 2005).

La maggior parte dei metodi utilizzati nella pratica clinica per la valutazione del danno cardiaco, quali l'ecocardiografia e l'angiografia con radio nucleotidi (Medicina Umana), ha mostrato una bassa accuratezza diagnostica ed uno scarso potere predittivo (Meinardi MT et al., 1999; Alexander J et al., 1979). Tali mezzi diagnostici, sono in grado di identificare il danno cardiaco solo quando esso ha già

avuto ripercussioni anatomo – funzionali a volte anche gravi, vanificando in questo modo ogni possibile strategia di prevenzione della cardiomiopatia. Per questo motivo, vi è una crescente aspettativa verso nuovi strumenti diagnostici non invasivi, sensibili, poco costosi e facilmente ripetibili che consentano di stratificare precocemente i pazienti in rapporto al loro rischio di disfunzione cardiaca da chemioterapici (Cardinale D., Sandri M T, 2004). Recenti studi sia in umana sia in veterinaria, hanno stabilito che la troponina I cardiaca è un indicatore molto specifico e sensibile di danno cardiaco (La Vecchia et al, 2000; Collins et al., 2001; Spratt et al., 2005). La troponina I cardiaca (cTnI) è una proteina contrattile presente esclusivamente nel muscolo cardiaco e quando si sviluppa un danno miocardico viene liberata ed è rilevabile a livello sierico (Spratt et al., 2005). Risultando quindi un buon marker di danno cardiaco. La metodica utilizzata per la sua determinazione a livello sierico è la stessa utilizzata in medicina umana, ossia si basa sull'Immunodosaggio in Chemiluminescenza con particelle paramagnetiche (ACCESS immunoassay System ACCU TnI). Tutto ciò è possibile in quanto gli anticorpi monoclonali utilizzati nella ricerca della cTnI dell'uomo, non sono specie - specifici e non cross - reagiscono con le isoforme di Troponina presenti nel muscolo scheletrico (Beckman - Coulter, 2001). Obiettivo del presente studio è di valutare l'eventuale tossicità che alcuni chemioterapici possono avere sulla funzionalità cardiaca. Verranno messi a confronto gruppi di cani trattati con: Doxorubicina, chemioterapico di provata cardiotossicità nel cane (Marconato et. al., 2005), da sola o in associazione (n. 5 casi), Clorambucile (n. 3 casi), Sali del Platino (n. 5 casi) e cardiotossico nell'uomo (Van den Belt – Dusebout AW et. al., 2006)

Un altro effetto legato alla chemioterapia è l'**immunosoppressione**. La somministrazione di agenti chemioterapici nei topi e nell'uomo ha effetti variabili sui differenti componenti del sistema immunitario. E' stata frequentemente riportata una

deplezione di linfociti in persone sottoposte a chemioterapia, ma il grado di deplezione linfocitaria sembra essere dipendente dal tipo di protocollo chemioterapico utilizzato (Walter et al. 2006, Kubota et al. 2001, Harris et al. 1976). La deplezione linfocitaria, specificatamente dei linfociti T CD4+, può persistere a lungo anche dopo il termine del protocollo chemioterapico (Azuma et al. 1998; Sara et al. 1999). Non tutti gli agenti chemioterapici sono però ugualmente immunosoppressivi. Per esempio, la ciclofosfamide somministrata a basse dosi può potenziare l'immunità umorale e diminuire la tolleranza immunologica (Emens et al. 2001, Walter et al. 2006). In altri studi ancora, la doxorubicina e i suoi derivati hanno effetti variabili sulla risposta immunitaria adattativa, con effetti immunostimolatori e di conservazione dell'immunità cellulo - mediata (Periti et al. 1987; Formelli et al. 1988). In aggiunta in medicina umana i chemioterapici a base di Taxane (controllare traduzione), hanno effetti immunostimolatori (Tsavaris et al., 2002). In un altro studio, le alterazioni della funzionalità immunitaria sembrano essere correlate alla risposta alla chemioterapia (Van Rijswijk et al., 1983). Il secondo obiettivo del presente studio è quindi quello di osservare se e come variano le sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico di cani sottoposti a chemioterapia. Tali sottopopolazioni linfocitarie verranno valutate tramite l'utilizzo della Citometria a Flusso, opportunamente marcate con anticorpi monoclonali specifici per tali sottopopolazioni.

Dai dati bibliografici, i chemioterapici che hanno dimostrato finora avere effetti più mielosoppressivi nel cane sono: doxorubicina, ciclofosfamide, vinblastina, carboplatino, actinomicina D e mitoxantrone (Marconato et al., 2005).

In questo studio, sugli stessi gruppi di cani su cui è stata dosata la cTnI, sono state messe a confronto le eventuali variazioni delle sottopopolazioni linfocitarie. I chemioterapici confrontati sono, quindi: Doxorubicina da sola o in associazione (n. 5

casi), Clorambucile (n. 3 casi) e derivati dei Sali del Platino (n. 5 casi). Nel caso in cui è stato utilizzato il chemioterapico temozolomide, per insufficienza di campione, non è stato possibile controllare l'andamento delle sottopopolazioni linfocitarie, pertanto si riporteranno soltanto i dati sul dosaggio della Troponina I Cardiaca.

I risultati così ottenuti verranno messi a confronto con il gruppo di controllo di cani giudicati clinicamente sani, su cui è stata dosata la cTnI e su cui è stata valutata la popolazione linfocitaria.

1.1 Troponina I Cardiaca

La Troponina I Cardiaca (cTnI) è una proteina contrattile presente esclusivamente nel muscolo cardiaco (Beckman Coulter, 2001). E' una delle tre sub - unità del complesso polipeptidico della troponina (I,T,C) che con la tropomiosina si legano all'actina nel sottile filamento della miofibrilla. La cTnI è presente sottoforma di Troponina libera I (TnI libera), complessata con la Troponina C (IC binaria), con la Troponina T (IT binaria) o con entrambe la Troponina C e la Troponina T (ITC ternaria) (Beckman Coulter, 2001). Il suo ruolo fisiologico è quello di inibire l'attività dell'ATPasi del complesso Actina - Miosina in assenza di calcio e quindi di inibire la contrazione muscolare (Troponin – Inhibitory - Component), mentre la Troponina T collega il complesso della Troponina con la Tropomiosina (Tropomyosin – Binding - Component) e la Troponina C reperisce il calcio per la contrazione muscolare (Calcium – Binding - Component).

Sono state identificate tre Isoforme di Troponina I:

- La Troponina I rapida (fs TnI) e la Troponina I lenta (ss TnI) con peso molecolare di 19800Da ciascuna, espresse nelle fibre dei muscoli scheletrici, rispettivamente a mioclona lenta e rapida;
- La Troponina I Cardiaca (cTnI), con peso molecolare di 24000 Da, espressa a livello di miocardio (Beckmann - Coulter, 2001).

E' stato ampiamente documentato che la cTnI è specifica del miocardio in quanto il muscolo scheletrico non esprime questa isoforma, né durante lo sviluppo, né in risposta a stimoli (Mair et al., 1996). Nei mammiferi inoltre tutte e tre le isoforme di Troponina I, sono codificate da geni differenti, di conseguenza la diversa composizione amminoacidica della proteina permette la differenziazione di queste molecole attraverso tecniche immunologiche (Anticorpi Monoclonali per la cTnI)

(Coudrey et al. 1998). Pertanto la cardiospecificità della cTnI consente di distinguere fra lesioni cardiache e scheletriche, permettendo di differenziare l'infarto miocardico da lesioni muscolari (Beckmann - Coulter, 2001).

Nelle cellule miocardiche, la Troponina I è contenuta, per la maggior parte, in strutture delimitate e, in misura ridotta, libera nel citosol. Questa distribuzione cellulare determina un rilascio precoce della quota libera nel citosol conseguente ad un insulto lieve della miocellula (Rishniw et al. 2002).

Insulti più severi o più protratti nel tempo portano, invece, alla liberazione anche della quota di Troponina contenuta dentro le strutture delimitate della miocellula, con conseguente danno cellulare irreversibile (Ettinger et al., 2000).

La concentrazione di cTnI nel plasma aumenta, quindi ogni qualvolta che si manifesta un danno cardiaco: dalla lieve perdita di integrità della membrana alla necrosi cellulare. In questo modo è possibile identificare un'associazione tra la portata del danno cardiaco e la concentrazione plasmatica di cTnI (Ettinger et al. 2000).

In pazienti sani, i livelli plasmatici di cTnI sono bassi o non rilevabili. Nel cane i valori considerati normali sono compresi nel seguente Range: 0,03 - 0,07 ng/ml (Sleeper et al., 2001).

In seguito ad un danno miocardico, la quota di cTnI libera nel citosol viene rilasciata precocemente ed è responsabile di un primo picco rilevabile nel plasma dalle 9 alle 16 ore dopo l'insulto; segue un lungo plateau che dura circa quattro giorni (96 ore) dopo il danno al miocardio (Coudrey L., 1998).

Secondo studi più recenti, i livelli plasmatici di cTnI sono rilevabili già dopo 4 ore dal danno cardiaco, con un picco massimo tra le 12 e le 24 ore e con un lento declino che può durare dai 5 ai 20 giorni (Spratt et al., 2005).

L'allenamento muscolare non implica rilascio di cTnI in circolo. La

cardiospecificità, l'innalzamento rapido ad ogni lieve danno miocardico ed il lungo plateau (circa da 96 h a 20 giorni), fanno della Troponina I Cardiaca un biomarker di danno miocardico sensibile, ripetibile, poco costoso e non invasivo; preferendolo ad altri enzimi marker di danno muscolari (CK e LDH). La Creatin chinasi (CK) e la Lattato Deidrogenasi (LDH) sono enzimi espressi non solo a livello miocardico, ma anche a livello di muscolatura scheletrica quindi non cardio – specifici; inoltre, si innalzano rapidamente ma si abbassano altrettanto rapidamente, quindi non utili nel lungo periodo ed aumentano anche in seguito ad un intenso esercizio fisico.

La metodica utilizzata per misurare la cTnI è la stessa applicata nell'uomo, ossia si basa sull'Immunodosaggio in Chemiluminescenza con particelle paramagnetiche con il metodo ACCESS ACCU TnI™ sul sistema UNICELL DXL 800 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA). Ciò è possibile poiché gli anticorpi monoclonali usati nella ricerca della cTnI dell'uomo non sono specie - specifici e non cross - reagiscono con le isoforme di Troponina presenti nel muscolo scheletrico (O'brien et al., 1997). La cTnI verrà valutata con dosaggio Immunoenzimatico a doppio sito (sandwich) in Chemiluminescenza in fase solida. L'analisi verrà effettuata presso il Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio – Az. Ospedaliera Università di Parma, con la gentile collaborazione della *Dott.ssa Aloe Rosalia*.

1.2 Cenni di Citometria a Flusso

Il Citofluorimetro è un valido strumento che permette l'analisi di una sospensione cellulare monodispersa iniettata in un sistema fluidico. In opportune condizioni idrodinamiche le cellule vengono trasportate in maniera separata ed ordinata fino al punto di misura, dove incontrano il fascio di luce focalizzata proveniente dal laser (Raskin and Meyer, 2010). Quando viene colpita dal fascio di luce emesso dal laser, la cellula emette segnali di luce diffusa in base alle proprie caratteristiche fisiche e morfologiche, per fenomeni di rifrazione, riflessione e diffrazione della luce stessa. Questi segnali sono legati, oltre alle caratteristiche fisiche della cellula, anche all'utilizzo di molecole fluorescenti (fluorocromi) (Culmsee et al., 2002). In particolare la luce dispersa in avanti (Forward Scatter) è legata alle dimensioni delle cellule, mentre la luce riflessa a 90° (Side Scatter) è da attribuire ai parametri della morfologia cellulare come la granulosità del citoplasma, il rapporto nucleo/citoplasma e la rugosità di superficie (Culmsee et al. 2002, Weiss 2002). Il diagramma ottenuto dalla combinazione di questi due tipi di segnale, permette di discriminare tra diverse popolazioni cellulari basandosi solamente sulle loro caratteristiche fisiche (citogramma). In aggiunta, la possibilità di utilizzare anticorpi, sia verso antigeni di superficie sia verso antigeni intracellulari, coniugati a fluorocromi, consente di identificare le singole cellule oltre che per le caratteristiche fisiche, anche per le proprietà antigeniche (Weiss, 2002).

Ogni fluorocromo presenta una caratteristica lunghezza d'onda per l'eccitazione e l'emissione. I fluorocromi vengono eccitati dal laser del citofluorimetro; un laser è in grado di emettere un fascio di luce ad una determinata lunghezza d'onda. La maggior parte dei citofluorimetri utilizza una sorgente luminosa ad ioni Argon centrata su una lunghezza d'onda di 488 nm (blu). Tale luce consente un'efficace misura dei

parametri fisici e la contemporanea eccitazione di differenti fluorocromi: FITC, PE, PerCp, PE Cy - 7. Per poter lavorare in altre altre lunghezze d'onda, si devono utilizzare altri tipi di laser. Una volta eccitato dal laser, il fluorocromo emette un fascio di energia che presenta una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella con cui viene eccitato e che è diversa per ogni tipo di fluorocromo. In questo modo è possibile, utilizzando anticorpi marcati con fluorocromi che hanno differenti lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione, rilevare contemporaneamente l'espressione di più molecole antigeniche sulla stessa cellula.

Numerose sono le applicazioni della citometria a flusso, sicuramente la più conosciuta e diffusa è l'analisi delle cellule ematopoietiche, per la tipizzazione di leucemie e linfomi (Raskin and Meyer, anno, 2010). I campioni analizzati tramite citometria, devono essere costituiti da cellule in sospensione e privi di detriti. Il sangue ed i versamenti cavitari in provette con anticoagulante, possono essere sottoposti direttamente all'analisi citometrica. Gli aspirati da tessuti solidi, invece, devono essere risospesi in appropriati mezzi di supporto (Raskin and Meyer, 2010). Esistono differenti mezzi di supporto, nel nostro studio, per la sospensione di cellule provenienti da agopuntato linfonodale, abbiamo utilizzato Phosphate – Buffer Saline (PBS).

Il citofluorimetro è in grado di analizzare un elevato numero di cellule in breve tempo dividendole per le loro caratteristiche fisiche ed antigeniche. I segnali generati dalle singole cellule, sono poi rielaborati dal computer collegato al citofluorimetro, che tramite specifici Software provvede a tradurre i segnali in grafici. Esistono differenti modi per rappresentare un dato citofluorimetrico (Istogramma, Dot - Plot, Contour - Plot, etc.) che essenzialmente si equivalgono.

L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita presso il Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Biomediche - Az. Ospedaliera Università di Parma, grazie alla gentile collaborazione della *Dott.ssa Rosanna Vescovini*.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Criteri di Inclusione: cani

Per questo studio è stato prelevato il sangue da 34 cani, successivamente divisi in due gruppi principali: cani “cl clinicamente sani” (n. = 10) (Tab. n. 1) e cani con neoplasia (n.= 24, di cui 14 sottoposti a chemioterapia) (Tab. n. 2).

I cani “*cl clinicamente sani*”, non presentano anomalie fisiche alla visita clinica, non hanno ricevuto nessun tipo di terapie nella settimana precedente lo studio e presentano un esame emocromocitometrico (CBC) con valori che rientrano nei range di riferimento dell'apparecchio con cui è stato effettuato (analizzatore Dyne 3500). Sono inclusi cani di entrambi i sessi (n. = 4 maschi interi, n. = 4 femmine sterilizzate, n. = 2 femmine intere), di differenti razze (n. = 7 meticci, n. = 1 Pastore Tedesco, n. = 1 Border Collie e n. = 1 Dobermann) e con un'età compresa tra i 2 ed i 12 anni (vedi Tab. 1).

Nel gruppo di *pazienti oncologici* sono stati *ammessi* tutti i cani con una neoplasia non cardiaca e non metastatica a livello polmonare trattati con agenti chemioterapici. Sono stati *esclusi* dallo studio pazienti con: malattie renali gravi, malattie infiammatorie acute, malattie cardiache preesistenti, malattie infettive e cani che avevano subito traumi toracici negli ultimi 30 giorni. I cani sono stati stadiati dai colleghi referenti mediante esame emato - biochimico completo, almeno 2 proiezioni radiografiche toraciche, ecografia addominale e visita cardiologica approfondita con eventuale esecuzione di ecocardiografia. Dei 24 cani con tumore, solo in 14 casi è stato possibile effettuare la chemioterapia (Vedi Tab.2). Gli altri 10 cani con tumore, non sono stati sottoposti a chemioterapia per due principali ragioni: mancato

consenso dei proprietari o per già critiche condizioni di salute del paziente.

I cani sottoposti a chemioterapia ed eventualmente deceduti nel corso della terapia, su consenso dei proprietari, sono stati conferiti presso il *Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica* per l'esame necroscopico con valutazione istologica del miocardio per evidenziare eventuali lesioni riferibili all'effetto tossico del chemioterapico. Sui 14 cani sottoposti a chemioterapia, 9 sono deceduti prima della fine del protocollo chemioterapico applicato, ma solo in un caso i proprietari hanno acconsentito ad effettuare l'esame autoptico (caso n. 4).

I 14 cani con tumore e sottoposti a chemioterapia, sono stati suddivisi in quattro gruppi sulla base dell'agente chemioterapico utilizzato. I quattro gruppi sono così costituiti: n. 5 cani trattati con Doxorubicina da sola (n. = 2) o in associazione (1 caso con Cisplatino, 2 casi nel protocollo CHOP dei due casi di linfoma trattati), n. 3 cani trattati con Clorambucile, n. 5 cani trattati con Sali del Platino (n. = 1 con cisplatino, n. = 4 con oxaliplatino) e n. 1 cane trattato con Temozolomide (V.Tab. 2).

Nei 24 cani con tumore è stata dosata la Troponina I Cardiaca (cTnI), tramite test ACCESS Immunoassay System ACCU TnI, e valutate le percentuali delle sottopopolazioni linfocitarie, tramite citometria a flusso, su sangue intero conservato in EDTA, 24 ore prima della somministrazione dell'agente chemioterapico. Nei 14 cani con tumore e sottoposti a chemioterapia, sono state successivamente seguite le eventuali variazioni della cTnI (14 su 14 cani) e delle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico (13 su 14 cani), con un prelievo di sangue a distanza di 24h dalle successive somministrazioni dei chemioterapici. Nel caso n. 24 è stato possibile effettuare solo il dosaggio della cTnI per mancanza di una quantità adeguata di campione.

Nei casi in cui è stato applicato un protocollo polichemioterapico (n. = 2 protocollo CHOP e n. = 1 Doxorubicina + Cisplatino), il prelievo è stato eseguito a 24 ore dalla somministrazione di un ogni singolo chemioterapico. Lo scopo di tali indagini è quello di identificare precocemente eventuali danni cardiaci, prima che questi possano influire negativamente sulla qualità di vita e sopravvivenza stessa del paziente e valutare come i chemioterapici influenzano il sistema immunitario. Il range della concentrazione della cTnI e delle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico, è stabilito sui valori medi ottenuti dalla valutazione di tali parametri sui 10 cani clinicamente sani utilizzati come gruppo di controllo. I valori delle sottopopolazioni linfocitarie sono state espresse sia come valore percentuale sia come valori assoluti ($\times 10^3 / \mu\text{l}$), corretti sul totale dei linfociti ottenuti tramite valutazione emocromocitometrica.

Nei 13 cani con linfoma, la diagnosi si è basata sulla visita clinica e sulla valutazione citologica degli strisci ottenuti per ago infissione dei linfonodi megalici interessati. Su tali linfonodi è stata eseguita anche la valutazione citofluorimetrica per l'identificazione Immunofenotipica del linfoma.

Nei due casi di leucemia linfocitica, la diagnosi si è basata sulla valutazione dell'esame emocromocitometrico, della striscio ematico e dell'analisi citofluorimetrica effettuata dai colleghi presso il loro laboratorio di riferimento (Lab. Vet. S. Marco). La scelta di inserire anche due casi di leucemia nello studio, è stata fatta per valutare comunque l'andamento delle sottopopolazioni linfocitarie, anche se si partiva da un Tempo 0 "non normale". Entrambe, inoltre, sono state trattate con Clorambucile, chemioterapico per cui si è deciso di valutare l'eventuale tossicità cardiaca. Il caso n. 7, di leucemia linfocitica, è stato successivamente eliminato dalla casistica perché presentante un dosaggio di Troponina I Cardiaca, già alto al Tempo 0, venendo così meno ai criteri di inclusione dello studio.

TABELLA n. 1: *Controlli Sani – Segnalamento.*

	segnalamento
1	Cane, meticcio F/S, 8 anni
2	cane, meticcio, F/S, 12anni
3	cane, meticcio, F/S, 3 anni
4	cane, meticcio, F, 4 anni
5	cane, Pastore Tedesco, M, 4 anni
6	cane, meticcio, M, 4 anni
7	cane, meticcio, F, 2 anni
8	cane, meticcio, M, 6.5 anni
9	cane, Border Collie M, 3 anni
10	cane, Dobermann F/S, 12 anni

TABELLA n. 2: *Cani con neoplasia (24 casi)*

	segnalamento	problema	provenienza	chemioterapia
Caso 1	cane, meticcio, M, 6anni	osteosarcoma omero Dx	Clinica Vet. Salò	doxorubicina + cisplatino
Caso 2	cane, meticcio, M, 4 anni	linfoma multicentrico immunofenotipo B	Clinica Medica Università Vet. Parma	Doxorubicina
Caso 3	cane, Labrador F/S, 7 anni	mastocitoma coscia sx	Clinica Medica Università Vet. Parma	Clorambucile
Caso 4	Cane, PT, M/I 6 anni	emangiosarcoma	Clinica Vet. Salò	Doxorubicina
Caso 5	Cane, Bassotto M, 10 anni	Adenocarcinoma sacchi anali	Clinica Vet. Salò	Oxaliplatino
Caso 6	Cane, Dobermann F/S, 9 anni	Leucemia linfocitica cronica	Clinica Vet. Miller	Clorambucile
Caso 7	Cane, meticcio, M, 13 anni	leucemia linfocitica cronica	Dott. Gariboldi	Clorambucile
Caso 8	Cane, Dogue De Bordeaux, M/C 7 anni	linfoma multicentrico immunofenotipo B	Clinica Vet. Miller	CHOP
caso 9	Cane, Meticcio, F/S, 8 anni	Carcinoma Vescicale	Clinica Vet. Salò	Cisplatino
Caso 10	Cane, Sharpei, F/S, 6 anni	Carcinoma mammario	Clinica Vet. Salò	Oxaliplatino
Caso 11	Cane, PT, F/S 7 anni	Carcinoma mammario	Clinica Vet. Salò	Oxaliplatino
Caso 12	Cane, Samoiedo F/S, 6 anni	Carcinoma mammario	Clinica Vet. Salò	oxaliplatino
Caso 13	Cane, Rhodesian F, 10 anni	Linfoma mediastinico immunofenotipo T	Clinica Medica Università Vet. Parma	NO CHEMIO
Caso 14	Cane, Segugio Posavatz, F, 7 anni	Linfoma Cutaneo immunofenotipo T	Clinica Medica Università Vet. Parma	NO CHEMIO

TABELLA n. 2: *Cani con neoplasia (24 casi) (continuo)*

	segnalamento	problema	provenienza	chemioterapia
Caso 15	Cane, PT, M 6 anni	linfoma multicentrico immunofenotipo B	Clinica Vet. Miller	NO CHEMIO
Caso 16	Cane, Bovaro del Bernese, M,	Linfoma multicentrico immunofenotipo B	Clinica Medica Università Vet. Parma	NO CHEMIO
Caso 17	Cane, meticcio M, 6 anni	linfoma multicentrico immunofenotipo B	Clinica Vet. Miller	deceduto prima della chemio
Caso 18	Cane, Beagle, M 6 anni	linfoma multicentrico immunofenotipo T	Clinica Vet. Miller	eutanasia a 20gg dalla diagnosi
Caso 19	Cane, meticcio, M 15 anni	linfoma multicentrico immunofenotipo B	Laboratorio Parmalab	deceduto prima della chemio
Caso 20	Cane, meticcio, F/S, 8 anni	linfoma multicentrico immunofenotipo B	Laboratorio Parmalab	NO CHEMIO
Caso 21	Cane, meticcio 1,5anni, M	linfoma mediastinico immunofenotipo B	Clinica Medica Università Vet. Parma	CHOP
Caso 22	cane, terranova 4,7 anni, F	linfoma multicentrico immunofenotipo T	Clinica Medica Università Vet. Parma	NO CHEMIO
Caso 23	cane, P.T., 5 anni F	linfoma multicentrico immunofenotipo T	Clinica Medica Università Vet. Parma	NO CHEMIO
Caso 24	Cane, meticcio, F 13 anni	tumore cerebrale	Clinica Vet. Salò	temozolomide (no citometria)

2.2 Campionamento

Da ogni cane (n. 10 = gruppo controllo; n. 24 = cani con tumore) sono stati prelevati 5 ml di sangue mediante venopuntura della vena cefalica o safena. Da questi 5 ml, sono state ottenute due aliquote da 2,5 ml ciascuna, conservate in provette contenenti Acido Etilendiamminicotetracetico (EDTA).

Un'aliquota è stata centrifugata a 3000 rpm per 10 minuti con "Centrifuge 4263 A" (vedi Tab. 3) ed il plasma stoccato a - 4°C fino al momento dell'analisi per il dosaggio della Troponina I Cardiaca.

Sull'altra aliquota sono stati eseguiti i seguenti esami: emocromocitometrico per valutare il numero totale dei leucociti (WBC) con analizzatore Dyne 3500, striscio ematico per valutare la conta leucocitaria differenziale in percentuale, sulla quale è stato ricavato il valore assoluto delle varie sottopopolazioni leucocitarie ed analisi citofluorimetrica entro 24 ore dall'arrivo del campione, per identificare la percentuale delle sottopopolazioni linfocitarie.

Come precedentemente precisato, nei cani con tumore e sottoposti a chemioterapia (14 cani su 24 cani con tumore), sono stati effettuati ulteriori prelievi a distanza di 24 ore dalla somministrazione del farmaco e per tutta la durata del ciclo. In questo modo si è cercato di identificare eventuali variazioni di cTnI e delle sottopopolazioni linfocitarie. Nel caso n. 24 trattato con Temozolomide è stato possibile valutare solo la cTnI, non sono state dosate le sottopopolazioni linfocitarie per campione insufficiente.

Nei 13 cani con linfoma, la diagnosi si è basata sulla visita clinica e sulla valutazione di preparati citologici, allestiti da agopuntati provenienti dai linfonodi interessati.

Una

parte del materiale ottenuto per ago infissione è stato strisciato su vetrini asciugati all'aria e colorati con colorazione May – Grunwald - Giemsa (MGG). I criteri citomorfologici di classificazione sono basati sulle dimensioni cellulari (“piccole”, “medie” o “grandi”), la forma dei nuclei; la densità della cromatina; il numero, la dimensione e la distribuzione dei nucleoli; il volume e la basofilia citoplasmatica (classificazione citomorfologica del linfoma canino secondo Kiel - modificata) (Marconato et al., 2005). L'indice mitotico è stimato su 5 campi a 400X, contando il numero di figure mitotiche e calcolandone la media. Un “basso” indice mitotico è definito per 0 - 1 mitosi per 5 campi, “medio” per 2 – 4 mitosi per 5 campi e “alto” per un numero di mitosi > 5 per 5 campi.

L'altra parte del materiale ottenuto dall'agopuntato è stata conservata in 800 µl di Phosphate – Buffer Saline (PBS), ed utilizzata per l'analisi citofluorimetrica per l'identificazione immunofenotipica del linfoma entro 4 ore dall'arrivo del campione.

2.3 ACCESS Immunoassay System ACCU TnI

La metodica utilizzata per il dosaggio della Troponina I Cardiaca, è la stessa utilizzata in campo umano, ossia l'Immunodosaggio in Chemiluminescenza con particelle paramagnetiche: metodo ACCESS ACCU TnI™ sul sistema UNICELL DXL 800 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA). Gli anticorpi monoclonali usati nella ricerca della cTnI nell'uomo, infatti, non sono specie - specifici.

Il test ACCESS ACCU TnI™ è un dosaggio immunoenzimatico a doppio sito ("sandwich"). Ad una cuvetta di reazione si aggiunge il campione di plasma insieme al coniugato anticorpi monoclonali anti - cTnI - fosfatasi alcalina e particelle paramagnetiche rivestite di anticorpi monoclonali anti - cTnI.

La cTnI del campione si lega agli anticorpi anti - cTnI sulla fase solida, mentre il coniugato anticorpi anti - cTnI - fosfatasi alcalina reagisce con siti antigenici diversi sulle molecole di cTnI. Dopo l'incubazione nella cuvetta di reazione, la separazione in un campo paramagnetico ed il lavaggio rimuovono i materiali non legati alla fase solida. Un substrato chemiluminescente viene aggiunto alla cuvetta e la luce generata dalla reazione è misurata con un luminometro. La produzione di luce è direttamente proporzionale alla concentrazione di cTnI presente nel campione. La quantità di analita nel campione viene determinata mediante una curva di calibrazione a più punti memorizzata nel sistema. Nel cane i valori di riferimento normali sono compresi nel seguente Range: 0,03 - 0,07 ng/ml (Sleeper et al. 2001).

Il dosaggio della cTnI è stato effettuato sia nel gruppo di controllo sia nei cani sottoposti a chemioterapia. In quest'ultimo gruppo è stata dosata la cTnI pre - chemio (T0), i successivi prelievi sono stati effettuati a 24 ore dalla somministrazione del chemioterapico, su plasma ottenuto per centrifugazione di

sangue intero in K3EDTA.

E' necessario specificare, che il campione ideale per la valutazione della cTnI, è il plasma in litio – eparina od il siero, tuttavia uno studio effettuato dalla Beckman Coulter, confrontando campioni di plasma in EDTA e campioni di plasma in eparina, ha fornito risultati sovrapponibili.

L'analisi è stata effettuata presso il Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio - Az. Ospedaliera Università Di Parma *Dott.ssa Aloe Rosalia*.

2.4 Valutazione Citofluorimetrica.

Il pannello anticorpale utilizzato per la valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico è così costituito: CD3 (linfociti T), CD4 (linfociti T - Helper), CD8 (Linfociti T - citotossici) e CD21 (linfociti B) (Vedi Tab. 4). A questo pannello è stato successivamente aggiunto il CD79a, utilizzato solo per marcare il materiale linfonodale, espresso dai linfociti B durante lo stadio di pre – B ed in molti linfomi ad immunofenotipo B, marker non di superficie ma citoplasmatico. Gli anticorpi utilizzati sono monoclonali e coniugati con il fluorocromo Istiocianato di Fluorescina (FITC) per CD3, CD8, CD4 e CD79a, o con Ficoeritrina (PE) per CD21 (vedi Tab. 4). Acquistati presso la ditta AbD Serotec, insieme al FACS Lysing Solution 10X, Leucoperm ed i tubi Falcon BD in poliestere Round – Bottom (vedi Tab. 3).

TABELLA n. 3: Materiali utilizzati

1. Provette con Acido Etilendiamminicotetracetico (K3EDTA) da 2,5ml
2. Biosphere Filter Tips 96No/REF 70.760.213 yellow - 20ml type Gilson/Eppendorf
3. Pipettenspitze 1000ml - Sarstedt
4. Eppendorf (2-20ml/ 20-200ml/ 100-1000ml)
5. BD Falcon tubi in poliestere Round-Bottom 5 ml 12X75mm style
6. Safe - Seal microtube 2 ml PP
7. Centrifuge 4236A - Cool Working Sistem (CWS)
8. Biochrom PBS Dulbecco w/o Ca²⁺, Mg²⁺ - Low endotoxin 500ml
9. FACS buffer, soluzione per lavaggi (PBS + BSA 0,2% + Sodioazide NaN₃ 0,1%)
10. FACS Lysing Solution, soluzione concentrata 10X - 100ml
11. Leucoperm reagent A 5 ml e reagent B 5 ml (Serotec)
12. Anticorpi monoclonali coniugati Serotec (CD3, CD4, CD8, CD21, CD79a)
13. Citofluorimetro FACS calibur BD (**Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Biomediche, Dott.ssa Rosanna Vescovini**)
14. ACCESS immunoassay System ACCU Tnl, sistema UNICELL DXL 800 (**Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio - Az. Ospedaliera Univ. Di Parma, Dott.ssa Aloe Rosalia**)

TABELLA n. 4: Pannello Anticorpi

* Tutti gli anticorpi sono forniti dalla ditta Serotec.

CD molecole *	Specificità	Clone Anticorpale	Fluorocromo	Concentrazione mg/ml
CD3 (cane)	T - Linfociti	CA17.2A12	FITC	0,1
CD4 (cane)	T - Helper / granulociti neutrofilii	YKIX302.9	FITC	0,1
CD8 (cane)	T - Citotossici	YCATE55.9	FITC	0,1
CD21 (cane)	B - linfociti / cellule follicolari dendritiche	CA2.1D6	RPE	ricostituito
CD79a (uomo)	B - linfociti (da stadio pre - B a plasmacellula)	HM57	FITC	0,1

Antigeni di superficie: metodica

Vengono allestiti n.5 tubi Falcon BD (vedi Tab.3): Tubo di controllo senza anticorpo, Tubo per CD3/CD21, Tubo per CD8 e Tubo per CD4. In ciascun tubo, vengono pipettati 50 µl di sangue intero in EDTA, aggiunti 3 µl di anticorpo, ad eccezione del tubo di controllo, ed incubati 30 minuti al buio (20 minuti a temperatura +4°C e 10 minuti a temperatura ambiente). Si procede con la lisi dei globuli rossi aggiungendo, a ciascun tubo, 2 ml di FACS Lysing Solution 10X diluita 1:10 (Vedi Tab. 3) ed incubati per 5 minuti al buio a temperatura ambiente. Si centrifuga a 4000 rpm per 5 minuti. Si procede a due lavaggi con 2 ml di FACS Buffer, infine si ricostituisce con 300µl di paraformaldeide per la lettura al citofluorimetro entro 48 h dall'allestimento del campione.

La stessa metodica viene applicata anche per la marcatura degli antigeni di superficie del materiale ottenuto dall'agoinfissione di linfonodi, sospeso in 800 µl di PBS e marcato entro 4 ore dall'arrivo. Le uniche differenze rispetto alla metodica applicata per immunomarcare il sangue sono: per ogni tubo vengono pipettati 100µl di campione invece di 50 µl ed alla fine il campione è ricostituito con 150 µl di paraformaldeide, invece di 300µl. La lisi dei globuli rossi è applicata anche per il puntato linfonodale al fine di eliminare un'eventuale contaminazione ematica che può interferire con la lettura citofluorimetrica.

Antigeni intracitoplasmatici: metodica

Questa metodica è utilizzata per la marcatura con il CD79a, utilizzato per immunofenotipizzare i linfomi ed espresso nei linfomi tipo B.

Per la marcatura con antigeni citoplasmatici, viene utilizzato il Leucoperm Reagent System per la fissazione e la permeabilizzazione delle cellule in sospensione (Vedi Tab. 3). Questa procedura consente l'accesso agli anticorpi a strutture intracellulari, lasciando intatte le caratteristiche morfologiche della cellula stessa. Vengono allestiti n. 2 tubi Falcon BD con 100 µl di sospensione cellulare ottenuta da ago puntato linfonodale sospeso in 800 µl di Phosphate – Buffer Saline (PBS): n. 1 tubo controllo, senza anticorpo, e n. 1 tubo per il CD79a. Vengono aggiunti 100 µl di reagente A (Fissativo) ed il tutto è incubato per 15 minuti a temperatura ambiente (Tab.3). Successivamente aggiungere 5 ml di PBS, vortexare e centrifugare a 1200 rpm per 5 minuti. Rimuovere il surnatante ed aggiungere 100 µl di reagente B (Permeabilizzante) insieme a 3 µl di anticorpo, vortexare a bassa velocità per 1 - 2 secondi ed incubare per 30 minuti al buio a temperatura ambiente. Dopo incubazione, risospendere le cellule in 4 ml di PBS e centrifugare per 10 minuti a 1200 rpm, rimuovere il surnatante e risospendere in 300 µl di paraformaldeide per la lettura citofluorimetrica entro 48 h dall'arrivo del campione.

Analisi Citofluorimetrica

Per l'analisi citofluorimetrica è stato utilizzato un citofluorimetro FACS Calibur (Becton -Dickinson) ed i dati sono stati acquisiti tramite il Software di analisi CellQuest (Tab. 3).

Nel sangue periferico, le tre differenti popolazioni leucocitarie (polimorfonucleati, monociti, linfociti), vengono identificate tramite le loro caratteristiche fisiche riguardanti le dimensioni cellulari (Forward Scatter) e la complessità citoplasmatica (Side Scatter). Da qui è stato selezionato solo il gate linfocitario. Sono stati acquisiti mediamente un totale di 150000 eventi, per avere in media 30000 eventi nel gate linfocitario. La percentuale di ogni sottopopolazione linfocitaria è determinata in risposta al tipo di fluorescenza. I valori assoluti vengono calcolati sulla base della conta totale linfocitaria, determinata dall'esame emocromocitometrico (CBC) effettuato il giorno stesso dell'analisi citofluorimetrica.

Per l'analisi del puntato linfonodale, sono stati acquisiti 10000 eventi vitali sul gate linfocitario stabilito sui parametri fisici di dimensioni e granulosità citoplasmatica. I valori delle sottopopolazioni linfocitarie sono espressi come percentuale sul 100% della popolazione acquisita in risposta alla fluorescenza. Lo scopo di tale analisi è quello di immunofenotipizzare il linfoma (B o T) a cui si associa la prognosi.

L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita presso il Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Biomediche - Az. Ospedaliera Università di Parma grazie alla gentile collaborazione della *Dott.ssa Rosanna Vescovini*.

3. Trattamento dati

Per completezza vengono riportati, in due Appendici a fine discussione, i dati relativi all'esame emocromocitometrico ed alla valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie di tutti i tempi successivi alla somministrazione dell'agente chemioterapico.

Nell'Appendice 1, sono riportati i valori relativi all'esame emocromocitometrico, eseguito con analizzatore Dyne 3500, dei 10 controlli sani e dei cani con tumore. In particolare sono stati indicati: ematocrito, numero totale dei globuli bianchi (WBC), percentuali e relativi valori assoluti delle sottopopolazioni leucocitarie. Nei 14 casi di cani con tumore in cui è stato possibile procedere con la chemioterapia, sono stati seguiti gli andamenti degli esami emocromocitometrici, con prelievi ogni 24 ore dalla somministrazione del chemioterapico.

Nell'Appendice 2, sono riportate le tabelle inerenti l'andamento delle sottopopolazioni linfocitarie nei 10 controlli sani e nei 24 cani con tumore, prima della somministrazione del chemioterapico e nei tempi successivi, 24 ore dopo ogni somministrazione, nei 14 cani in cui è stata effettuata la chemioterapia. Ogni sottopopolazione linfocitaria è espressa sia come percentuale, sia come valore assoluto corretto sul totale dei linfociti ottenuti dall'esame emocromocitometrico.

I 14 cani sottoposti a chemioterapia, sono stati suddivisi in tre gruppi a seconda del chemioterapico a cui sono sottoposti: Doxorubicina (n. 5 casi, di cui 2 casi in monochemioterapia, 1 caso in associazione con cisplatino e 2 casi inserita nel protocollo CHOP) (Tab. n. 5), Sali del Platino (n. 4 casi con Oxaliplatino e n. 1 caso con Cisplatino) (Tab. n. 6) e Clorambucile (n. 3 casi) (Tab. n. 7).

Il caso n.7, trattato con Clorambucile, è stato successivamente eliminato dallo studio perché presentante un dosaggio di cTnI già alto al Tempo 0 (Tab. n. 8).

Di questi gruppi sono stati confrontati i dati delle sottopopolazioni linfocitarie al tempo “zero”, ossia prima della chemioterapia, ed al tempo 1 (T1). Il Tempo T1, corrisponde alla situazione delle sottopopolazioni linfocitarie al momento del “nadir”, ossia al punto più basso dei valori nel tempo delle cellule ematiche dopo somministrazione dell’agente chemioterapico. Ogni chemioterapico ha il suo “nadir”. Nella doxorubicina il “nadir” si ha dopo 6 - 10 giorni, nei Sali del Platino dopo 6 – 14 giorni e nel Clorambucile dopo 7 – 10 giorni.

La maggior parte dei farmaci chemioterapici induce mielosoppressione, cioè la distruzione delle cellule staminali e progenitrici contenute nel Midollo Osseo. In maniera più o meno selettiva, tutte e tre le linee ematopoietiche sono compromesse: globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. Tuttavia data che l’emivita dei neutrofilo è più breve rispetto alle altre due linee cellulari, il “nadir” corrisponde al punto più basso del WBC. Il Tempo 1 è stato identificato valutando nell’esame emocromocitometrico il momento in cui il numero totale dei globuli bianchi (WBC), si trovava nel punto più basso ed è, quindi, differente da caso a caso.

Una volta identificato il tempo 1, sono state approntate 3 gruppi di tabelle inerenti ai 3 gruppi di chemioterapici utilizzati. In ciascun gruppo, in una tabella, sono stati riportati e messi a confronto il numero totale di globuli bianchi (WBC), il numero assoluto dei granulociti, dei monociti e dei linfociti, nei due tempi (T0, pre – chemioterapia e T1 post – chemioterapia). Nell’altra tabella, sono state riportate e messe a confronto, le percentuali ed i relativi numero assoluti delle sottopopolazioni linfocitarie, nei due tempi (T0 e T1).

Per i 10 controlli sani (Tab. n. 9) e per i tre gruppi di chemioterapici (Doxorubicina, Sali del Platino, Clorambucile) (Tab. n. 10 – 11 – 12), sono state approntate ulteriori tabelle, riportanti l'andamento della Troponina I Cardiaca durante il protocollo chemioterapico utilizzato. Sono stati riportati anche i dati relativi all'unico caso trattato con Temozolomide (Tab. 13). Come per la valutazione dell'andamento delle sottopopolazioni linfocitarie, i controlli del dosaggio plasmatico della cTnI sono stati effettuati a distanza di 24h dalla somministrazione dell'agente chemioterapico.

TABELLA n. 5: Doxorubicina (Gruppo 1)

Nella Tabelle che seguono, sono riportati i dati relativi alle variazioni, dal Tempo T0 (pre-chemioterapia) al Tempo T1 (Nadir, riportato tra parentesi in giorni), dei 5 cani trattati con Doxorubicina in monochimioterapia (M) o in polichimioterapia (P) (si vedano anche i dati sul tipo di protocollo utilizzato riportati nelle Appendici). Gli asterischi indicano che tra i due dati esiste una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$)

CASO	WBC X10 ³ /μl da 6 a 15		Granulociti X10 ³ /μl da 2 a 11,5		Monociti X10 ³ /μl da 0,3 a 2		Linfociti X10 ³ /μl da 0,5 a 4,9	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
1 (P) (4gg)	13	3,6	10,1	3,3	0,3	0,03	2,7	0,3
2 (M) (7gg)	21,9	11,1	17,9	8,4	0,4	0,1	3,5	2,5
4 (M) (30gg)	10	2,7	8,3	2	0,1	0,03	1,6	0,6
8(P) (7gg)	13,9	8,8	11,9	6,8	0,1	0,9	1,8	1,1
21(P) (28gg)	21	6,9	17,2	6,2	0,8	0,3	2,9	0,4
mediana	13,9*	6,9*	11,9*	6,2*	0,3	0,1	2,7*	0,6*
min-max	10 - 21,9	2,7-11,1	8,3-17,9	2-8,4	0,1-0,8	0,03-0,9	1,6-3,5	0,3-2,5

* $p < 0,05$

CASO	CD 3 %		CD3 X10 ³ /μl		CD4 %		CD4 X10 ³ /μl		CD8 %		CD8 X10 ³ /μl		CD21 %		CD21 X10 ³ /μl		CD4/CD8	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
	74,97+/-8,61		1,61+/-0,49		43,68+/-6,39		0,91+/-0,13		21,41+/-4,43		0,44+/-0,15		13,36+/-7,11		0,25+/-0,05		1,54+/-1,5	
1 (P) (4gg)	41	53	1,1	0,2	28,1	37,6	0,8	0,1	7,2	10,4	0,2	0,03	45,1	33	1,2	0,1	4	3,3
2 (M) (7gg)	53	31,6	1,9	0,8	26,7	34,4	0,9	0,9	10,1	15,7	0,4	0,4	28	1,5	1	0,04	2,3	2,3
4 (M) (30gg)	78	73	1,2	1,4	27,7	7,7	0,4	0,1	18,6	8,4	0,3	0,2	16,1	2,1	0,3	0,04	1,3	0,5
8(P) (7gg)	33	38,4	0,6	0,3	25,4	15,8	0,5	0,2	15,2	17,4	0,3	0,2	1,7	0,7	0,03	0,01	1,7	1
21(P) (28gg)	43,8	50,3	1,3	0,2	43,3	26,8	1,3	0,1	24	26,3	0,7	0,1	2,3	0,9	0,1	0,00	1,9	1
mediana	43,8	50,3	1,2	0,3	27,7	26,8	0,8	0,1	15,2	15,7	0,3	0,2	16,1*	1,5*	0,3*	0,0*	1,9	1,0
min-max	33-78	31,6-73	0,6	0,2	25,4-43,3	7,7-37,6	0,4-1,3	0,1-0,9	7,2-24	8,4-26,3	0,2-0,7	0,1	0,4	0,7-33	0,03-1,2	0,0-0,1	1,3-4	0,5-3,3

* $p < 0,05$

TABELLA n. 6: Sali del Platino (Gruppo 2)

Nella Tabelle che seguono, sono riportati i dati relativi alle variazioni, dal Tempo T0 (pre-chemioterapia) al Tempo T1 ((Nadir, riportato tra parentesi in giorni), dei 5 cani trattati con Sali del Platino: Cisplatino (C) ed Oxaliplatino (O). (si vedano anche i dati sul tipo di protocollo utilizzato riportati nelle Appendici). Gli asterischi indicano che tra i due dati esiste una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$)

CASO	WBC X10 ³ /μl da 6 a 15		Granulociti X10 ³ /μl da 2 a 11,5		Monociti X10 ³ /μl da 0,3 a 2		Linfociti X10 ³ /μl da 0,5 a 4,9	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
	5 (O) (7gg)	8,6	5,8	6,4	4,3	0,3	0,2	1,9
9 (C) (7gg)	17	14	16,3	14,4	0,2	1	0,5	0,3
10(O) (14gg)	19,3	16	17	15,5	0,2	0,2	1,8	0,4
11 (O) (7gg)	10	5	7,9	4,5	0,1	0	2	0,6
12 (O) (7 gg)	7,5	5,9	6,7	4,6	1,4	0,1	1,9	1,2
mediana	10,0*	5,9*	7,9*	4,6*	0,2	0,2	1,9*	0,6*
min-max	7,5-19,3	5-16,0	6,4-17	4,3-15,5	0,1-1,4	0-0,2	0,5-1,9	0,3-1,3

* $p < 0,05$

CASO	CD 3 %		CD3 X10 ³ /μl		CD4 %		CD4 X10 ³ /μl		CD8 %		CD8 X10 ³ /μl		CD21 %		CD21 X10 ³ /μl		CD4/CD8		
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	
		74,97+/-8,61		1,61+/-0,49		43,68+/-6,39		0,91+/-0,13		21,41+/-4,43		0,44+/-0,15		13,36+/-7,11		0,25+/-0,05		1,54+/-1,5	
5 (O) (7gg)	82	65	1,6	0,8	53,6	26,8	1	0,3	6,5	4,3	0,1	0,1	8,8	2,1	0,2	0,03	10	5	
9 (C) (7gg)	45,6	24,8	0,2	0,1	45,1	10,6	0,2	0,03	15,2	14,7	0,1	0,04	10,9	17,9	0,1	0,1	2	0,4	
10(O) (14gg)	40	52	0,7	0,2	19,1	31,7	0,3	0,1	2,9	5,7	0,1	0,02	26,7	2,9	0,5	0,01	3	5	
11 (O) (7gg)	40,5	15,8	0,8	0,1	21,6	15,2	0,4	0,1	16	7,7	0,3	0,1	35,9	16,8	0,7	0,1	1,3	2	
12 (O) (7 gg)	45,3	48,2	0,9	0,6	41	34,1	0,8	0,4	4	22,9	0,1	0,3	13	14,1	0,2	0,2	8	1,3	
mediana	45,3	48,2	0,8*	0,2*	41,0	26,8	0,4*	0,1*	6,5	7,7	0,1	0,1	13,0	14,1	0,2	0,1	3,0	2,0	
min-max	40-82,0	15,8-65	0,2-1,6	0,1-0,8	19,1-53,6	10,6-34,1	0,2-1	0,03-0,4	4-15,2	5,7-22,9	0,1-0,3	0,02-0,3	8,8-35,9	2,9-17,9	0,1-0,7	0,01-0,2	2-10,0	0,4-5	

* $p < 0,05$

TABELLA n. 7: Clorambucile (Gruppo 3)

Nella Tabelle che seguono, sono riportati i dati relativi alle variazioni, dal Tempo T0 (pre-chemioterapia) al Tempo T1 ((Nadir, riportato tra parentesi in giorni), dei 2 cani trattati con Clorambucile. (si vedano anche i dati sul tipo di protocollo utilizzato riportati nelle Appendici). Si riportano anche i dati relativi al Caso n.7, trattato con Clorambucile, ma successivamente eliminato perché presentante un dosaggio di cTnI al tempo T0, già fuori Range. Gli asterischi indicano che tra i due dati esiste una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$)

CASO	WBC X10 ³ /μl da 6 a 15		Granulociti X10 ³ /μl da 2 a 11,5		Monociti X10 ³ /μl da 0,3 a 2		Linfociti X10 ³ /μl da 0,5 a 4,9	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
3 (6gg)	7,1	6,2	5,7	4,6	0,1	0,1	1,2	1,6
6 (7gg)	27,2	13,5	12,3	9,3	0	0,3	14,9	4,7
mediana	17,2	9,9	9,0	7,0	0,1	0,2	8,1	3,2
min-max	7,1-27,2	6,2-13,5	5,7-12,3	4,6-7	0-0,1	0,1-0,2	1,2-14,9	1,6-4,7

* $p < 0,05$

CASO	CD 3 %		CD3 X10 ³ /μl		CD4 %		CD4 X10 ³ /μl		CD8 %		CD8 X10 ³ /μl		CD21 %		CD21 X10 ³ /μl		CD4/CD8	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
3 (6gg)	80,5	13,1	1	0,2	17,1	22,7	0,2	0,4	16,8	6	0,2	0,1	7	1,4	0,1	0,0	1	4
6 (14gg)	69,3	80	10,3	3,8	5,6	6	0,8	0,3	40	75	6	3,5	0,3	10,4	0,04	0,5	0,1	0,1
mediana	74,9	46,6	5,7	2,0	11,4	14,4	0,5	0,4	28,4	40,5	3,1	1,8	3,7	5,9	0,1	0,3	0,6	2,1
min-max	69,3-80,5	13,1-80	1-10,3	0,2-3,8	5,6-17,1	6-22,7	0,2-0,8	0,3-0,4	16,8-40	6,0-75,0	0,2-6	0,1-3,5	0,3-7	1,4-10,4	0,04	0,5	0,1-1	0,1-4

* $p < 0,05$

7 (7gg)	WBC X10 ³ /μl da 6 a 15		Granulociti X10 ³ /μl da 2 a 11,5		Monociti X10 ³ /μl da 0,3 a 2		Linfociti X10 ³ /μl da 0,5 a 4,9											
		34,5	62,8	20,3	35,1	0,7	0,6	13,5	27									
	CD 3 %		CD3 X10 ³ /μl		CD4 %		CD4 X10 ³ /μl		CD8 %		CD8 X10 ³ /μl		CD21 %		CD21 X10 ³ /μl		CD4/CD8	
	74,97+/-8,61		1,61+/-0,49		43,68+/-6,39		0,91+/-0,13		21,41+/-4,43		0,44+/-0,15		13,36+/-7,11		0,25+/-0,05		1,54+/-1,5	
	85,4	78,8	11,5	21,3	1,5	5,6	0,2	1,5	8,5	5,8	1,1	1,6	85,3	78,8	11,5	21,3	0,2	0,9

ELIMINATO

TABELLA n. 8 : Troponina Cardiaca I
Controlli Sani

SANI	cTnI 0,03-0,07 ng/μl
1	0,01
2	0,02
3	0,01
4	0,02
5	0,00
6	0,00
7	0,00
8	0,01
9	0,00
10	0,00
media	0,01
dev.stand.:	+ / - 0,01

TABELLA n. 9 : Troponina Cardiaca I
Doxorubicina (Gruppo 1)

	caso 2 solo doxorubicina	caso 4 solo doxorubicina	caso 1 doxo + cisplatino	caso 8 doxo in protocollo CHOP	caso 21 doxo in protocollo CHOP
T0	0,03	0,05	0,02	0,06	0,02
T1	0,03	0,05	0,02	*0,15 (doxo)	0,02
T2	0,03	*0,13	0,03	deceduto	0,02
T3	*0,1	*0,09	0,06		0,00
T4	*0,15	*0,13	deceduto		0,00
T5	0,06	*0,08			deceduto
T6	fine chemio	*0,1			
T7		*0,1			
T8		*0,12			
T9		*0,16 deceduto			

range cTnI: 0,03-0,07 ng/ml

* : fuoriscala

TABELLA n. 10 : Troponina Cardiaca I
Sali del Platino (Gruppo 2)

	Caso 9 cisplatino	Caso 5 oxaliplatino	Caso 10 oxaliplatino	Caso 11 oxaliplatino	Caso 12 oxaliplatino
T0	0,03	0,02	0,04	0,04	0,05
T1	*0,08	*0,26	0,04	0,04	*0,14
T2	*0,14	0,01	0,04	0,03	0,06
T3	deceduto	0,01	deceduto	0,06	deceduto
T4		0,01		0,02	
T5		0,01		0,04	
T6		0,01		0,04	
T7		0,01		fine chemio	
T8		0,01			
T9		0,01 fine chemio			

range cTnI: 0,03-0,07 ng/ml

* : fuoriscala

TABELLA n. 11 : Troponina Cardiaca I
Clorambucile (Gruppo 3)

A fianco vengono riportati i dati relativi al Caso n.7, trattato con Clorambucile, ma successivamente eliminato perché presentante un dosaggio di cTnI già alto al T0

Troponina I Cardiaca 0,03-0,07 ng/μl	Caso 7
T0	*0,24
T1	*1,04
T2	deceduto

ELIMINATO

	Caso 3	Caso 6
T0	0,01	0,02
T1	0,03	0,03
T2	0,03	0,06
T3	0,02	deceduto
T4	0,02	
T5	0,02	
T6	0,01	
T7	0,01	
T8	0,01	
T9	0,01	
T10	0,02	
T11	0,00	
T12	0,00 fine chemio	

range cTnI: 0,03-0,07 ng/ml

* :
fuoriscala

TABELLA n. 12 : Troponina Cardiac I
Temozolomide

Di seguito vengono riportati i dati relativi all'unico caso trattato con Temozolomide

	cTnl 0,03-0,07 ng/μl
T0	0,04
T1	*0,11
T2	*0,08
T3	0,04
T4	deceduto

range cTnl: 0,03-0,07 ng/ml

*** : fuoriscala**

3.1 Analisi Statistica.

L'analisi statistica, dei tre gruppi (gruppo 1: Doxorubicina, Gruppo 2: Sali del Platino, Gruppo 3: Clorambucile), è stata effettuata sul numero totali di globuli bianchi (WBC), sui valori assoluti delle popolazioni leucocitarie (granulociti, monociti, linfociti), sulle percentuali e sui valori assoluti delle sottopopolazioni linfocitarie valutate durante i 2 tempi successivi dello studio (T0 e T1), nei 14 cani sottoposti a chemioterapia. E' stato utilizzato il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati sui valori mediani. I test statistici sono stati eseguiti con il programma StatView. Per tutti i confronti sono stati considerati significativi valori della p inferiori a 0,05 e molto significativi valori della p inferiori a 0,01.

Sulla valutazione dell'andamento della Troponina I Cardiaca, non è stato possibile approssimare uno studio statistico dei dati, per esiguità di risultati, conseguenza principale dei decessi imprevedibili dei pazienti, prima della fine del protocollo chemioterapico, con impossibilità, quindi di avere dati omogenei.

3.2 Risultati

I 10 cani clinicamente sani, utilizzati come gruppo di controllo, hanno mostrato valori assoluti delle sottopopolazioni linfocitarie sovrapponibili a quanto descritto in bibliografia (Gauthier M.J et al., 2005) (Tab.n. 13). In tale studio venivano testati 12 cani clinicamente sani che non presentavano anomalie alla visita clinica, malattie degenerative ortopediche, che non avessero ricevuto terapie nella settimana precedente lo studio e con un esame emocromocitometrico con valori all'interno del Range di riferimento del laboratorio. Non veniva fatta distinzione di razza, sesso ed età. Il gruppo di cani clinicamente sani, testati nel mio studio ricalca le caratteristiche di quanto appreso e definito dallo studio della bibliografia.

TABELLA n. 13: Controlli sani (n. 10 cani)*Esame emocromocitometrico e Sottopopolazioni Linfocitarie**Il Range preso in considerazione delle sottopopolazioni linfocitarie, fa riferimento ai dati pubblicati in bibliografia (Guathier et al., 2005)*

	WBC (X10 ³ /μl) da 6 a 15	NEU (X10 ³ /μl) 2-11,5	LYM(X10 ³ /μl) 0,5-4,9	MONO (X10 ³ /μl) 0,3-2
1	9,5	7,3	1,7	0,5
2	10	7,6	2	0,4
3	9	6,7	1,9	0,5
4	12,5	4,4	2,7	0,4
5	11	8,2	2,4	0,3
6	9	6,1	2,7	0,2
7	12	8,6	3	0,4
8	13,5	9,5	3,2	0,5
9	12,5	9,4	2,9	0,3
10	10,3	8	2,1	0,2

	CD3X10 ³ /μl 1,61+/-0,49	CD4X10 ³ /μl 0,91+/-0,13	CD8X10 ³ /μl 0,44+/-0,15	CD21X10 ³ /μl 0,25+/-0,05	CD4/CD8 1,54+/-1,5
1	1,0	0,8	0,3	0,1	2,6
2	1,0	0,6	0,3	0,1	2,0
3	1,1	0,6	0,3	0,2	2,0
4	1,1	0,7	0,3	0,6	2,3
5	1,0	0,8	0,2	0,2	2,3
6	1,8	0,8	0,3	0,4	2,6
7	1,7	1,0	0,4	0,1	2,5
8	2,0	1,0	0,9	0,3	2,5
9	1,4	0,8	0,6	0,3	1,3
10	1,3	0,7	0,5	0,4	1,4

Il **gruppo 1** comprende n. 5 cani trattati con *Doxorubicina*. Di questi 5 cani, n. 2 cani sono stati trattati con Doxorubicina in monochemioterapia, n. 1 cane è stato trattato con un'associazione di Doxorubicina e Cisplatino e n. 2 cani sono stati trattati con Doxorubicina in protocollo CHOP per linfoma. La valutazione statistica del numero totale dei globuli bianchi (WBC) e delle tre popolazioni leucocitarie (Granulociti, Monociti e Linfociti) nei due tempi considerati (T0 – T1), ha mostrato un calo significativo ($p < 0,05$), in tutti e cinque i cani, dei WBC, dovuto ad un calo significativo ($p < 0,05$) sia dei granulociti sia dei linfociti. Il numero assoluto dei monociti dal Tempo 0 al Tempo 1, ha mostrato un calo non significativo ($p > 0,05$) in 4 cani su 5. Il calo significativo del numero assoluto dei linfociti, è rappresentato essenzialmente da un calo significativo ($p < 0,05$), evidente in tutti e 5 i cani, della sottopopolazione CD21+ (linfociti B), sia nella percentuale, sia nel valore assoluto. In 3 casi su 2 ed in 1 caso su 4, si è osservato un calo non significativo ($p > 0,05$) della sottopopolazione CD3+ (linfociti T), sia come percentuale sia come valore assoluto, accompagnato da un calo in valore assoluto dei CD4+ (T – Helper) e dei CD8+ (T – Citotossici), con conseguente calo del rapporto CD4/CD8. Il calo dei linfociti CD4+ (T – Helper) e CD8+ (T – Citotossici) e del loro rapporto, non è risultato ad ogni modo significativo dal punto di vista statistico ($p > 0,05$) (Tab. n. 5).

Nel **gruppo 2**, sono inseriti n. 5 cani trattati con *Sali del Platino* (n. 1 cane trattato con Cisplatino e n. 4 cani trattati con Oxaliplatino). Si è osservato in tutti e 5 i cani, un calo significativo del numero totale dei globuli bianchi (WBC) ($p < 0,05$), corrisposto da un altrettanto calo significativo ($p < 0,05$) del numero assoluto dei granulociti e dei linfociti, ma non dei monociti che: calano in 3 cani su 4, in un cane aumentano ed in un cane restano di pari numero nei due tempi (T0 – T1). Le variazioni osservate sulla popolazione monocitaria, non risultano ad ogni modo significative. Il calo del numero assoluto dei linfociti è associato ad un calo

significativo ($p < 0,05$), del valore assoluto ma non delle percentuali, in tutti e 5 i casi, della sottopopolazione linfocitaria CD3+ (linfociti T). Tale calo è a sua volta associato ad un calo significativo ($p < 0,05$) del solo valore assoluto e non del valore percentuale, dei linfociti CD4+ (T – Helper), ma non dei linfociti CD8+ (T – Citotossici) che calano non in maniera significativa ($p > 0,05$).

In 3 casi su 5 si è osservato un calo non significativo ($p > 0,05$) del rapporto CD4/CD8, nei restanti 2 casi su 5 si è, invece osservato un aumento di tale rapporto.

In 3 casi su 5 si ha una diminuzione non significativa ($p > 0,05$) del valore assoluto dei linfociti CD21+ (linfociti B), mentre in 2 casi su 5 tale valore è rimasto invariato nel prima e nel dopo chemioterapia (Tab. n. 6).

Nel **gruppo 3**, sono stati inseriti n. 3 cani trattati con *Clorambucile*. Un caso, è stato successivamente eliminato dallo studio, perché presentante un dosaggio di cTnI già alto al Tempo 0 (pre – chemio). Nei 2 casi rimasti, si è osservato un calo non significativo ($p > 0,05$) del numero totale dei globuli bianchi (WBC) associato ad un calo non significativo dei granulociti. In un caso il numero assoluto dei linfociti è aumentato, nell'altro caso è invece diminuito. In un caso il numero assoluto dei monociti è aumentato, nell'altro caso è invece diminuito. Le variazioni delle sottopopolazioni linfocitarie presentano andamenti a volte opposti nei due casi considerati ed in ogni modo non significativi ($p > 0,05$), si è osservato un calo in numero assoluto, in entrambi i casi, dei linfociti CD3+ (linfociti T), corrisposto da un calo del numero assoluto dei soli linfociti CD8+ (linfociti T – citotossici). In un caso su due, si è osservato un calo del numero assoluto dei linfociti CD4+ (linfociti T – Helper) e CD21+ (linfociti B), mentre nell'altro caso l'andamento è risultato essere esattamente contrario, con aumento di entrambe le sottopopolazioni (CD4+ e CD21+). Tale discordanza di risultati può essere in parte giustificato dalla risposta

del paziente alla chemioterapia. Nel caso n°3, infatti si ha avuto la remissione completa a fine trattamento; nel caso n°6 invece il paziente è deceduto dopo la seconda somministrazione, facendo supporre una mancata risposta al protocollo chemioterapico. Non è quindi possibile trarre conclusioni sugli effetti del Clorambucile a livello di sottopopolazioni linfocitarie, si può solo notare un calo dei WBC e dei granulociti che non è però statisticamente significativo (Tab. n. 7). È possibile che estendendo il numero di pazienti trattati con tale chemioterapico, si possano avere conclusioni più chiare sull'effetto sulle sottopopolazioni linfocitarie linfociti.

La Doxorubicina ed i Sali del Platino, portano ad un calo significativo del numero totale dei globuli bianchi (WBC), determinato da un calo significativo sia dei granulociti sia dei linfociti, ma non dei monociti. A livello di sottopopolazioni linfocitarie, tale variazione è data da un calo significativo ($p < 0,05$) dei linfociti CD21+ (linfociti B), sia in valore assoluto sia in valore percentuale, ma non delle altre sottopopolazioni (CD3, CD4, CD8) che calano ma non in maniera significativa, nel gruppo 1 trattato con Doxorubicina. Nel gruppo 2, trattato con Sali del Platino invece, il calo dei linfociti è dato dalla diminuzione significativa, del solo valore assoluto, dei linfociti CD3+ (linfociti T), in particolare della sottopopolazione CD4+ (T – Helper), ma non dei linfociti CD8+ (linfociti T- citotossici. La Doxorubicina sembra quindi influenzare negativamente la componente linfocitaria B, mentre i Sali del Platino sembra abbiano un effetto negativo principalmente sui linfociti T, in particolare sui Linfociti T – Helper.

I 10 cani clinicamente sani, utilizzati come gruppo di controllo, hanno mostrato dosaggi di Troponina I Cardiaca all'interno del Range di riferimento (0,03 – 0,07 ng/mL) trovato in bibliografia (Sleeper M. et al, 2001) (Tab. n. 9).

Sulla valutazione dell'andamento della Troponina I Cardiaca, non è stato però possibile approssimare uno studio statistico dei dati, per esiguità di risultati, conseguenza principale dei decessi imprevedibili dei pazienti prima della fine del protocollo chemioterapico con impossibilità, quindi, di avere dati omogenei. Nel **Gruppo 1** trattato con *Doxorubicina*, si osserva un aumento dei valori di cTnI in 3 casi su 5. Tale aumento si è verificato tra la prima e la terza settimana dall'inizio del protocollo chemioterapico (Tab. n.10). Nel **Gruppo 2**, trattato con *Sali del Platino*, si è osservato, come nel gruppo precedente, un aumento del valore della cTnI in 3 casi su 5. Tale aumento si è verificato in tutti e tre i casi, già alla prima settimana di trattamento (Tab. n. 11). Sarebbe, dai pochi dati a disposizione, che la cardiotoxicità chemioterapica – indotta sia associata sia alla Doxorubicina, già noto come cardiotossico (Marconato et. al, 2005), sia ai Sali del Platino, noto come cardiotossico nell'uomo (Silber JH et al. 2004; Van den Belt - Dusebout AW et Al. 2006; Cardinale D., Sandri M T, 2004), ma non descritto come tale nel cane ed associato ad altre forme di tossicità (nefrotossicità, ototossicità e mielosoppressione a doppio picco) (Marconato et. al, 2005). Nel gruppo 2 trattato con Sali del Platino, tale aumento di cTnI, sembra più precoce, verificandosi già alla prima settimana di trattamento.

Nei 2 casi trattati con *Clorambucile* (**Gruppo 3**), non si hanno avuti aumenti di cTnI, sembrerebbe quindi che tale chemioterapico non abbia effetti cardiotossici (Tab. n. 11).

Nello studio della Troponina I Cardiaca, è stato inserito un unico caso trattato con Temozolomide, chemioterapico utilizzato di rado in Medicina Veterinaria. Si osserva un aumento marcato della cTnI già alla prima somministrazione (Tab. n. 12). Sarebbe interessante, quindi ampliare casistica su questo tipo di chemioterapico

valutando i potenziali effetti cardiotossici.

Come previsto dal protocollo iniziale di lavoro, i cani sottoposti a chemioterapia ed eventualmente deceduti nel corso della terapia, su consenso dei proprietari, sono stati conferiti presso il *Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica* per l'esame necroscopico con valutazione istologica del miocardio per evidenziare eventuali lesioni riferibili all'effetto tossico del chemioterapico. Sui 14 cani sottoposti a chemioterapia, 9 sono deceduti prima della fine del protocollo chemioterapico applicato, ma solo in un caso i proprietari hanno dato il consenso ad effettuare l'esame autoptico (caso n. 4). Il cane era in chemioterapia con Doxorubicina per emangiosarcoma splenico. Si è osservato un aumento oltre il Range di riferimento (0,03 – 0,07 ng/ml) (Sleeper et al., 2001), alla seconda somministrazione di Doxorubicina che si è protratto fino alla nona settimana. A tale data, per le scarse condizioni di salute del paziente, i proprietari ne hanno richiesto l'eutanasia. All'esame necroscopico viene rilevata una piccola neoformazione alla base del cuore e la valutazione istologica consente di evidenziare una piccola proliferazione irregolare di cellule endoteliali che si arrangiano in vortici formando ampi canali e raccolte di emazie, non infiltranti il miocardio. Le fibre miocardiche, presentano fenomeni di degenerazione torbida e più raramente di vacuolizzazioni.

4. DISCUSSIONE

La maggior parte degli agenti chemioterapici, è scarsamente selettiva nei confronti delle cellule bersaglio; ad essere distrutti, infatti, non sono solo i tessuti neoplastici in attiva proliferazione, ma anche alcuni dei normali tessuti a rapida crescita dell'ospite (per esempio le cellule dell'epitelio dei villi intestinali e quelle del midollo osseo) (Nelson R.W. et. al., 2006; Bexfield, 2006). La mielosoppressione e la sintomatologia gastroenterica rappresentano quindi le più comuni manifestazioni tossiche riscontrate nella pratica clinica (Nelson R.W. et. al., 2006; Bexfield, 2006). Altre complicazioni meno frequenti, associate all'uso dei chemioterapici, includono le reazioni anafilattiche, la tossicità cutanea, cardiaca (Doxorubicina), polmonare e dell'apparato urinario (Es.: cistite emorragica sterile da cisplatino), la pancreatite, la neurotossicità e l'epatopatia (Nelson R.W. et. al., 2006; Bexfield, 2006). In questo studio sono stati valutati due effetti secondari, non terapeutici (cardiotossicità e mielosoppressione), di tre diversi agenti chemioterapici frequentemente utilizzati nella pratica clinica: Doxorubicina, Sali del Platino (Cisplatino e Carboplatino) e Clorambucile.

La mielosoppressione è sicuramente il più frequente e grave effetto tossico conseguente alla somministrazione di farmaci citotossici, potenzialmente mortale e che richiede spesso la sospensione del farmaco stesso (Nelson R.W. et. al., 2006; Bexfield, 2006). Tale effetto collaterale colpisce tutte e tre le linee cellulari midollari: globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. Data la più breve emivita plasmatica (4 - 8h) dei granulociti, è facile, quindi, intuire che la mielosoppressione sia associata principalmente a neutropenia (Nelson R.W. et. al., 2006). In questo studio si è voluto osservare quale effetto produce l'utilizzo di agenti chemioterapici (Doxorubicina, Sali del Platino e Clorambucile), sul numero totale dei linfociti circolanti e sulle singole sottopopolazioni linfocitarie (CD3, CD4, CD8, CD21).

La **Doxorubicina** appartiene al gruppo delle Antracicline al suo ampio spettro d'azione, si associano numerosi effetti tossici (Marconato L., 2007; Kitchell B., 2008). La tossicità acuta include: mielosoppressione, sintomi gastroenterici, necrosi tissutale in caso di stravasamento ed alopecia (Chun et al., 2007; Kitchell B., 2008). E' considerato uno dei chemioterapici più mielosoppressivi, insieme a: ciclofosfamide, vinblastina, carboplatino, actinomicina D e mitoxantrone (Marconato et al., 2005).

I **Derivati del Platino** hanno come prototipo del gruppo il Cisplatino, con ampio spettro d'azione, ma con una tossicità non trascurabile che limita il numero di pazienti che possono essere trattati (Marconato L., 2007). 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 (Marconato L., 2007). Di recente utilizzo è l'Oxaliplatino. Al Cisplatino è legata nefrotossicità dose-dipendente, ototossicità, neuropatia periferica, ed è inoltre molto emetico e mielosoppressivo (Marconato L., 2007; Marconato L., 2009, Bexfield N., 2006). In Medicina Umana, l'Oxaliplatino è associato a neurotossicità acuta e cronica, ed in minor misura a sintomi gastroenterici (nausea, vomito), neutropenia, reazioni allergiche, rara nefrotossicità, ototossicità e riduzione della capacità visiva (Grothey A., 2003; Bonadonna G., 2003). Non ho trovato, nei testi e nei dati bibliografici consultati, riferimenti riguardo ai suoi effetti tossici in Medicina Veterinaria.

Il **Clorambucile** appartiene al gruppo degli Agenti Alchilanti insieme al Temozolomide. Il suo effetto tossico è associato ad una mielosoppressione dose-limitante e cumulativa, lieve tossicità gastroenterica e tossicità neurologica rara e reversibile (Marconato L., 2009; Kitchell B., 2008).

I risultati da noi ottenuti, hanno confermato l'effetto mielosoppressivo associato a tutti e tre gli agenti chemioterapici. Tale effetto è dato da un calo, al Tempo T1 (nadir) rispetto al Tempo T0 (pre - chemioterapia), del numero totale dei globuli

bianchi (WBC) associato ad un calo del numero assoluto di Granulociti e di Linfociti, ma non di Monociti. Tale calo (WBC, Granulociti, Linfociti) è statisticamente significativo ($p < 0,05$) sia nel gruppo trattato con Doxorubicina (Gruppo 1) sia in quello trattato con Sali del Platino (Gruppo 2), ma non nel gruppo trattato con Clorambucile (Gruppo 3). In quest'ultimo gruppo, si è avuto un comportamento a volte discordante sui due casi inseriti, con un aumento del numero totale dei Linfociti in un caso ed un calo in un altro; in entrambi i casi, però, si è osservato un calo non significativo dei WBC e dei Granulociti. A livello di sottopopolazioni linfocitarie è interessante osservare come nel **Gruppo 1** (Doxorubicina), il calo del numero assoluto di linfociti, sia dato da un calo significativo ($p < 0,05$) della sottopopolazione linfocitaria CD21+ (linfociti B), ma non delle altre sottopopolazioni (CD3, CD4, CD8) che calano in maniera non costante in tutti e 5 i casi inseriti, ma il calo non è mai significativo da punto di vista statistico (Tab. n. 5). Nel **Gruppo 2** (Sali del Platino), al contrario, il calo del numero assoluto di linfociti circolanti, è dato da un calo significativo della sottopopolazione CD3+ (linfociti T) accompagnato da un calo significativo della componente CD4+ (linfociti T – Helper), ma non della componente CD8+ (Linfociti T – citotossici) che presentano un andamento variabile nei 5 casi inseriti nel gruppo (Tab. n. 6). Nel **Gruppo 3** (Clorambucile), si è osservato un calo non significativo dei linfociti CD3+ (linfociti T) con un calo variabile e discordante delle componenti CD4+ e CD8+, inoltre in un caso si è osservato un aumento della sottopopolazione CD21+ in un caso ed una diminuzione nell'altro caso. L'esiguità di dati per questo gruppo, non consente di trarre conclusioni precise riguardo l'andamento delle sottopopolazioni linfocitarie (Tab. n. 7). E' possibile ipotizzare che l'andamento contrario del numero assoluto di linfociti, possa essere attribuito non tanto ad un effetto del Clorambucile stesso, ma quanto al tipo di neoplasia trattata (1 mastocitoma ed 1 leucemia

linfocitica cronica) e ad una sua mancata risposta alla chemioterapia. Il caso n. 6, è deceduto dopo la seconda somministrazione di Clorambucile, facendo supporre una mancata risposta alla terapia intrapresa o per alterazioni sistemiche incompatibili con la vita; se la risposta alla chemioterapia fosse stata ottimale, probabilmente si sarebbe evidenziato un andamento differente delle sottopopolazioni linfocitarie .

In conclusione è possibile evidenziare un effetto neutropenizzante e linfopenizzante significativo, associato all'utilizzo di Doxorubicina e Sali del Platino che riguarda la sottopopolazione CD21+ (linfociti B), per la Doxorubicina, e la sottopopolazione CD3+/CD4+ (linfociti T e T-Helper) per i Sali del Platino. In accordo con quanto riportato in bibliografia, la somministrazione di chemioterapici produce effetti variabili sui differenti componenti del sistema immunitario, con deplezione dei linfociti il cui grado può dipendere dal tipo di protocollo chemioterapico utilizzato (Walter et al. 2006, Kubota et al. 2001, Harris et al. 1976). Infine, non tutti i chemioterapici possono essere considerati ugualmente immunosoppressivi (Walter et al., 2006).

Un altro possibile effetto collaterale della chemioterapia, è la cardiotoxicità. Tale effetto è meno frequente della mielosoppressione, ed in Medicina Veterinaria è riportato in seguito all'utilizzo della Doxorubina ((Marconato et al., 2005). Esistono due tipi di cardiotoxicità da Doxorubicina: una tossicità acuta ed una tossicità cronica. La tossicità acuta è reversibile ed è legata ad aritmie cardiache transitorie durante la somministrazione del chemioterapico, non preclude l'utilizzo successivo della chemioterapia (Marconato L., 2009; Befield N., 2006). La tossicità cronica è legata alla cardiomiopatia dilatativa e conseguente insufficienza cardiaca congestizia. E' dose - dipendente, cumulativa ed irreversibile, la sua comparsa può verificarsi anche dopo anni dalla fine del protocollo chemioterapico, riduce la qualità di vita del paziente ed in alcuni casi porta a morte (Marconato L, 2009; Befield N., 2006; Chun

R., 2007). Non è associata cardiotoxicità in medicina Veterinaria né al Clorambucile, né ai Sali del Platino (Cisplatino e Oxaliplatino). Al contrario, in Medicina Umana, la cardiotoxicità è stata associata anche all'utilizzo di Cisplatino (Citfci O. et al., 2010) mentre all'Oxaliplatino è associata soprattutto neurotossicità acuta e cronica (Grothey A., 2003; Bonadonna G., 2003). Non sono invece riportati, nella scheda tecnica, casi di cardiotoxicità da Oxaliplatino somministrato singolarmente. Vengono invece riportati n.2 casi di manifestazioni cardiotoxiche (Flutter atriale) conseguenti a somministrazione di Oxaliplatino in protocollo associato con 5 – Fluorouracile in un caso e Gemcitabina nell'altro. Per entrambi (5 – Fluorouracile e Gemcitabina) è segnalata cardiotoxicità (Jensen S.A., 2006). Non è chiaro, quindi, se la cardiotoxicità nei due casi descritti in Medicina Umana, sia legata ad Oxaliplatino o sia data da 5 – Fluorouracile e Gemcitabina (Morrow et al., 2006).

Interessante è stato avere la possibilità, in questo studio, di valutare la cardiotoxicità non solo legata alla Doxorubicina, ormai nota come tale, ma e soprattutto di studiare il comportamento dei Sali del Platino (Cisplatino e Oxaliplatino) a livello cardiaco, non riportati come cardiotossici in Medicina Veterinaria. Altro dato interessante riguarda il chemioterapico Temozolomide, di cui è inserito un solo caso. In bibliografia sono riportati dati discordanti. In un testo viene riportato il suo effetto mielosoppressivo dose – limitante e di tossicità gastroenterica ma non segnala tossicità né cardiaca né renale (Marconato L., 2009). Nell'altro testo viene ribadito l'effetto mielosoppressivo e di tossicità gastroenterica, ma segnala nel 20% dei gatti, la comparsa di “effetti” avversi cardiaci, non precisati, e di versamenti pleurici (Kitchell B., 2008).

Per la valutazione di un'eventuale danno cardiaco, viene dosata la Troponina Cardiaca I (cTnI) a 24 ore dalla somministrazione del chemioterapico. Dai dati

bibliografici, il valore normale di cTnI a livello sierico nel cane, è compreso nel seguente Range: 0,03 – 0,07 ng/ml, con un valore medio di 0,02 ng/ml (Sleeper Margaret M. et al., 2001). Concentrazioni plasmatiche di cTnI superiori a 0,07ng/ml, sono considerate patologiche (Sleeper Margaret M. et al., 2001).

I dati ottenuti dal presente lavoro, hanno messo in evidenza un mancato aumento di cTnI, oltre al Range di riferimento, in entrambi i 2 casi trattati con Clorambucile, ipotizzando un'assenza di cardiotoxicità da parte di tale chemioterapico (Tab. n. 11). Si sono invece osservati aumenti di cTnI in 3 casi su 5, sia nei cani trattati con Doxorubicina, sia nei cani trattati con Sali del Platino (n.1 cane trattato con Cisplatino, n. 2 cani trattati con Oxaliplatino). Nel Gruppo 1 (Doxorubicina), tale aumento si è verificato tra la prima e la terza settimana di trattamento; mentre nel Gruppo 2 (Sali del Platino) in tutti e tre i casi, l'aumento si è verificato già dopo la prima somministrazione. Con i pochi dati a disposizione, non è possibile trarre delle conclusioni certe, ma da quanto emerso si conferma un effetto cardiossico associato a Doxorubicina e si segnala l'aumento di cTnI nei tre casi trattati con Sali del Platino (Tab. n. 9-10). La cTnI, inoltre, rimane costantemente elevata nei casi trattati con Doxorubicina e nel singolo caso trattato con Cisplatino, fino al decesso o fino alla fine del protocollo chemioterapico, mentre nei 2 casi trattati con Oxaliplatino, si ha un iniziale aumento al Tempo T1, con un ritorno nel Range, nei tempi successivi. Sembra, inoltre, i Sali del Platino abbiano un effetto cardiossico più precoce rispetto alla Doxorubicina, comparando già dopo la prima settimana di trattamento. Tale fenomeno potrebbe essere, in parte, giustificato dal fatto che la tossicità cardiaca da Doxorubicina può essere cronica, legata alla somministrazione cumulativa del farmaco oltre la dose di 240 mg/m² ed irreversibile, quindi presentare un'insorgenza più lenta ma prolungata nel tempo, con danni cardiaci permanenti. Con i pochi casi trattati con Sali del Platino tale tossicità cardiaca sembra più precoce

come insorgenza. Interessante sarebbe ampliare la casistica di cani trattati con Sali del Platino, per la precisione con Cisplatino e Oxaliplatino, per confermare o meno i risultati ottenuti in questo studio. Ultima osservazione è nel singolo caso trattato con Temozolomide, in cui si è verificato un aumento della cTnI già dopo la prima somministrazione del farmaco (Tab. n. 12); anche in questo caso sarebbe interessante approfondire il discorso con l'ampliamento della casistica. Sembra avere un effetto cardiotossico anche tale chemioterapico.

In conclusione ampliando la casistica sullo studio di cardiotossicità chemioterapica-indotta, potrebbero essere identificati nuovi chemioterapici, oltre la Doxorubicina, potenzialmente cardiotossici.

Ringraziamenti

Considero il lavoro svolto in questa ricerca, non come fatto da una singola persona, ma nato dalla collaborazioni di più mani, per cui prenderò alcuni minuti per ringraziare tutti coloro che hanno speso un po' del loro tempo nella realizzazione di tale progetto. Alla mia Tutor, Dott.ssa Benedetta Passeri, per il suo supporto didattico e per avermi trasmesso le sue conoscenze sulle tecniche di immunomarcatura rendendomi autonoma nelle procedure di Laboratorio. Al Professore Antonio Ubaldi che ha reso possibile la realizzazione del progetto, grazie al suo supporto finanziario. Alla Dott.ssa Aloe Rosalia ed alla Dott.ssa Rosanna Vescovini per il loro supporto tecnico per il dosaggio della cTnI (Dott.ssa Aloe Rosalia) e per la lettura Citofluorimetrica (Dott.ssa Rosanna Vescovini), per la loro disponibilità a darmi chiarimenti.

Infine, un grazie a tutti i colleghi liberi professionisti che mi hanno inviato casistica. Sperando di non dimenticare nessuno grazie a: Sezione Clinica Medica Vet.- Dip. Salute Animale Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma (Prof. Ezio Bianchi), Dott. Gariboldi Marco - Modena, Casa di Cura Veterinaria S. Geminiano - Modena (Dott.ssa Vanna Tintorri), Clinica Veterinaria Miller - Cavriago (Dott.ssa Chiara Agnoli e Dott. Luca Battaglia), Clinica Vet. Sant'Antonio - Salò (Dott. Giacoboni) e Dott.ssa Renata Passalacqua – Modena.

Ogni ricerca a volte porta dei risultati a volte lascia dei dubbi, ma molto spesso apre la mente a nuove ricerche.

APPENDICE 1: Esami Emocromocitometrici.

Qui di seguito vengono riportati gli esami Emocromocitometrici dei 34 cani inseriti nello studio: 10 cani clinicamente sani e 24 cani con tumore. Dei 14 cani con tumore e sottoposti a chemioterapia, sono riportati gli esami emocromocitometrici anche dei tempi successivi; sono stati sottolineati i valori al tempo T0 e i valori al tempo T1 (Nadir), identificato come il momento dove il numero totale di globuli bianchi è più basso.

	Controlli sani											
	HCT	WBC (X10 ⁹ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ⁹ /μl)	LYM(X10 ⁹ /μl)	MONO(X10 ⁹ /μl)	EOS(X10 ⁹ /μl)	BASO(X10 ⁹ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
1	46	9,5	73	18	5	4	0	6,9	1,7	0,5	0,4	0,0
2	45	10,0	72	20	4	4	0	7,2	2,0	0,4	0,4	0,0
3	48	9,0	72	21	5	2	0	6,5	1,9	0,5	0,2	0,0
4	50	12,5	73	23	3	1	0	9,3	2,7	0,4	0,1	0,0
5	42	11,0	70	22	3	5	0	7,7	2,4	0,3	0,5	0,0
6	50	9,0	65	30	2	3	0	5,8	2,7	0,2	0,3	0,0
7	45	12,0	70	25	3	2	0	8,4	3,0	0,4	0,2	0,0
8	40	13,5	67	24	4	4	1	9,0	3,2	0,5	0,5	0,1
9	42	12,5	71	23	2	4	0	8,9	2,9	0,3	0,5	0,0
10	40	10,3	68	20	2	10	0	7,0	2,1	0,2	1,0	0,0

CASI 1 (osteosarcoma)
Cane, meticcio, M, 6 anni
Doxorubicina 30mg/m² + cisplatino
60mg/m²

	HCT	WBC (X10 ⁹ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ⁹ /μl)	LYM(X10 ⁹ /μl)	MONO(X10 ⁹ /μl)	EOS(X10 ⁹ /μl)	BASO(X10 ⁹ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	32	13,0	75	21	2	2	0	9,8	2,7	0,3	0,3	0,0
T1	33	3,6	88	8	1	3	0	3,2	0,3	0,03	0,1	0,0
T2	42	6,2	75	21	2	2	0	4,5	1,3	0,1	0,1	0,0
T3	42	5,0	88	8	1	3	0	4,4	0,4	0,1	0,2	0,0

DECEDUTO

CASO 2 (linfoma immunofenotipo B)

Cane, meticcio, M, 4 anni

Doxorubicina 30 mg/m²

	HCT	WBC (X10 ³ /μ)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μ)	LYM(X10 ³ /μ)	MONO(X10 ³ /μ)	EOS(X10 ³ /μ)	BASO(X10 ³ /μ)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	34	21,9	81	16	2	1	0	17,7	3,5	0,4	0,2	0
T1	39	12,8	84	12	1	3	0	10,7	1,5	0,1	0,4	0
T2	40	11,1	75	23	1	1	0	8,3	2,5	0,1	0,1	0
T3	41	16,5	76	21	2	1	0	12,5	3,5	0,3	0,2	0
T4	42	13,7	75	24	0	1	0	10,3	3,3	0,0	0,1	0
T5	35	14,9	59	39	2	0	0	8,8	5,8	0,3	0,0	0

CASO 3 (mastocitoma con metastasi al lfn tributario)

cane, Labrador, F/S, 7 anni

Clorambucile 2mg/m²

	HCT	WBC (X10 ³ /μ)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μ)	LYM(X10 ³ /μ)	MONO(X10 ³ /μ)	EOS(X10 ³ /μ)	BASO(X10 ³ /μ)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	45	7,1	79	17	2	2	0	5,6	1,2	0,1	0,1	0
T1	39	7,4	79	17	2	2	0	5,8	1,3	0,1	0,1	0
T2	37	6,2	72	26	1	1	0	4,5	1,6	0,1	0,1	0
T3	34	6,7	66	31	2	1	0	4,4	2,1	0,1	0,1	0
T4	38	7,4	86	12	1	1	0	6,4	0,9	0,1	0,1	0
T5	37	9,3	71	26	2	1	0	6,6	2,4	0,2	0,1	0
T6	36	6,5	73	23	2	2	0	4,7	1,5	0,1	0,1	0
T7	35	11,2	75	20	3	2	0	8,4	2,2	0,3	0,2	0
T8	34	14,7	80	16	2	2	0	11,8	2,4	0,3	0,3	0
T9	39	9,8	89	7	1	3	0	8,7	0,7	0,1	2,7	0
T10	37	14,8	76	21	2	1	0	11,2	3,1	0,3	0,1	0
T11	40	7,1	78	19	1	2	0	5,5	1,3	0,1	0,1	0
T12	41	12,8	77	19	1	3	0	9,8	2,4	0,1	0,4	0

CASO 4 (emangiosarcoma)

Cane, PT, M/I, 6 anni

Doxorubicina 30mg/m²

	HCT	WBC (X10 ³ /μ)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μ)	LYM(X10 ³ /μ)	MONO(X10 ³ /μ)	EOS(X10 ³ /μ)	BASO(X10 ³ /μ)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	40	10,0	80	16	1	3	0	8,0	1,6	0,1	0,3	0
T1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T4	28	6,0	85	10	2	3	0	5,1	0,6	0,1	0,2	0
T5	32	2,7	70	24	1	5	0	1,9	0,6	0,03	0,1	0
T6	34	11,8	71	24	2	3	0	8,4	2,8	0,2	0,3	0
T7	33	8,0	72	25	1	2	0	5,8	2,0	0,1	0,2	0
T8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

deceduto

CASO 5 (adenocarcinoma sacchi anali)

Cane, Bassotto, M, 10

anni

oxaliplatino 30mg/m²

	HCT	WBC (X10 ³ /μ)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μ)	LYM(X10 ³ /μ)	MONO(X10 ³ /μ)	EOS(X10 ³ /μ)	BASO(X10 ³ /μ)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	47	8,6	68	22	3	7	0	5,8	1,9	0,3	0,6	0
T1	44	5,8	71	23	3	3	0	4,1	1,3	0,2	0,2	0
T2	40	9,0	72	22	1	5	0	6,5	2,0	0,1	0,5	0
T3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T4	33	8,0	85	10	2	3	0	6,8	0,8	0,2	0,2	0
T5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

CASO 6 (leucemia linfocitica cronica)

Cane, Dobermann, F/S, 9 anni

Clorambucile: 2 mg/m²

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	45	27,2	44	55	0	1	0	12,0	14,9	0,0	0,3	0
T1	37	15,0	55	43	1	1	0	8,3	6,5	0,2	0,2	0
T2	40	13,5	60	35	2	3	0	8,1	4,7	0,3	1,2	0

deceduto

CASO 7 (leucemia linfocitica cronica)

Cane, meticcio, M, 13 anni

Clorambucile 2 mg/m²

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	22	34,5	59	39	2	0	0	20,3	13,5	0,7	0,0	0
T1	26	62,8	55	43	1	1	0	34,5	27,0	0,6	0,6	0

deceduto

CASO 8 (linfoma multicentrico tipo B)

Cane, Dogue de Bordeaux, M/C, 7 anni

protocollo: CHOP

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	41	13,9	75	13	1	11	0	10,4	1,8	0,1	1,5	0
T1	29	8,8	76	13	10	1	0	6,7	1,1	0,9	0,1	0

deceduto

CASO 9 (Carcinoma vescicale)

Cane, Meticcio, F/S, 8 anni

cisplatino 60 mg/m²

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	36	17,0	96	3	1	0	0	16,3	0,5	0,2	0,0	0
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T1	-	-	--	--	-	--	--	-	-----	--	--	--
T2	56	14,0	96	2	1	1	0	13,4	0,3	1,0	1,0	0

deceduto

CASO 10 (carcinoma mammario)

Cane, Sharpei, F/S, 6 anni

oxaliplatino 50 mg/m²

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	48	19,3	88	11	1	0	0	17	1,8	0,2	0,0	0
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T1	-	-	--	--	-	--	--	-	-----	--	--	--
T2	42	16	97	2	1	0	0	15,5	0,4	0,2	0,0	0

deceduto

CASO 11 (carcinoma mammario)

Cane, PT, F/S, 7 anni

oxaliplatino 50 mg/m²

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	53	10	75	20	1	4	0	7,5	2,0	0,1	0,4	0
T1	54	5	89	11	0	0	0	4,5	0,6	0,0	0,0	0
T2	58	9,5	80	15	2	3	0	7,6	1,4	0,2	0,3	0
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T3	--	--	--	--	--	--	--	-	-	-----	-	-
T4	30	7	82	15	1	2	0	5,7	1,0	0,1	0,1	0
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T5	-	-	--	-	-----	--	-	-	-	-----	-----	-----
T6	46	45,9	72	9	12	7	0	33	4,1	5,5	3,2	0

CASO 12 (Carcinoma mammario)

Cane, Samoiedo, F/S, 6

anni

oxaliplatino 50mg/m²

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	41	7,5	71	25	2	2	0	5,3	1,9	1,4	1,4	0
T1	35	5,9	73	20	2	5	0	4,3	1,2	0,1	0,3	0
T2	----	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-	-	-	-	--	-	-	-	-----	--	--	-

deceduto

CASO 13 (linfoma mediastinico, immunofenotipo T)

Cane, Rhodesian, F, 10

anni

NO CHEMIO

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	38	14,5	81	15	2	2	0	11,7	2,2	0,3	0,3	0

CASO 14 (linfoma cutaneo immunofenotipo T)

Cane, Segugio Posavatz, F, 7 anni

NO CHEMIO

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	52	37,5	84	13	3	0	0	31,5	4,9	1,1	0,0	0

CASO 15 (linfoma multicentrico immunofenotipo B)
 Cane, Pastore Tedesco, M, 6 anni
 NO CHEMIO

	HCT	WBC (X10 ³ /μ)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μ)	LYM(X10 ³ /μ)	MONO(X10 ³ /μ)	EOS(X10 ³ /μ)	BASO(X10 ³ /μ)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	37	12,9	85	5	10	0	0	11	0,7	1,3	0,0	0,0

CASO 16 (Linfoma multicentrico immunofenotipo B)
 Cane, Bovaro del Bernese, M,
 NO CHEMIO

	HCT	WBC (X10 ³ /μ)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μ)	LYM(X10 ³ /μ)	MONO(X10 ³ /μ)	EOS(X10 ³ /μ)	BASO(X10 ³ /μ)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	37	12,9	85	5	10	0	0	11	0,7	1,3	0,0	0,0

CASO 17 (linfoma multicentrico immunofenotipo B)
 Cane, meticcio, M, 6 anni
 NO CHEMIO

	HCT	WBC (X10 ³ /μ)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μ)	LYM(X10 ³ /μ)	MONO(X10 ³ /μ)	EOS(X10 ³ /μ)	BASO(X10 ³ /μ)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	39	9,9	85	7	7	1	0	8,4	0,7	0,7	0,1	0

CASO 18 (linfoma multicentrico immunofenotipo B)
 Cane, Beagle, M, 6 anni
 NO CHEMIO

	HCT	WBC (X10 ³ /μ)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μ)	LYM(X10 ³ /μ)	MONO(X10 ³ /μ)	EOS(X10 ³ /μ)	BASO(X10 ³ /μ)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	34	9,8	71	16	8	5	0	7,0	1,5	0,8	0,5	0,1

CASO 19 (linfoma multicentrico immunofenotipo B)
Cane, meticcio, M, 15 anni
NO CHEMIO

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	40	8,7	82	12	1	5	0	7,1	1,0	0,1	0,4	0,0

CASO 20 (linfoma multicentrico immunofenotipo B)
Cane, meticcio, F/S, 8 anni
NO CHEMIO

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	26	7,1	88	7	1	4	0	6,2	0,5	0,1	0,3	0,0

CASO 21 (Linfoma mediastinico B)
cane, Meticcio, M, 1,7 mesi
protocollo: CHOP

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	36	21	81	14	4	1	0	17	2,9	0,8	0,2	0,0
T1	31	18,9	77	19	3	1	0	14,5	3,6	0,6	0,2	0,0
T2	34	15,2	90	7	1	2	0	13,7	1,1	0,2	0,3	0,0
T3	34	15	90	8	0	2	0	13,5	0,8	0	1,8	0,0
T4	29	6,9	80	6	4	10	0	5,5	0,4	0,3	0,7	0,0

deceduto

CASO 22 (linfoma multicentrico T)
Cane, Terranova, F, 4 anni e 7 mesi
NO CHEMIO

	HCT	WBC (X10 ³ /μl)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μl)	LYM(X10 ³ /μl)	MONO(X10 ³ /μl)	EOS(X10 ³ /μl)	BASO(X10 ³ /μl)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	39	46,4	89	8	2	1	0	41,3	3,7	0,9	0,5	0,0

CASO 23 (linfoma multicentrico T)
 Cane, Pastore Tedesco, F, 5 anni
 NO CHEMIO

	HCT	WBC (X10 ³ /μ)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μ)	LYM(X10 ³ /μ)	MONO(X10 ³ /μ)	EOS(X10 ³ /μ)	BASO(X10 ³ /μ)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	48	8,7	66	30	2	2	0	5,7	2,6	0,2	0,2	0,0

CASO 24 (tumore cerebrale) solo cTnI
 Cane, meticcio, F, 13 anni
 Temozolomide

	HCT	WBC (X10 ³ /μ)	%NEU	%LYM	%MONO	%EOS	%BASO	NEU (X10 ³ /μ)	LYM(X10 ³ /μ)	MONO(X10 ³ /μ)	EOS(X10 ³ /μ)	BASO(X10 ³ /μ)
	37-54	da 6 a 15	da 60 a 73	da 12 a 32	da 1 a 5	da 1 a 5	da 0 a 1	2-11,5	0,5-4,9	0,3-2	0,1-1,49	0-0,1
T0	58	10,3	85	10	5	0	0	8,7	1,0	0,5	0,0	0,0
	----				----		-----		-----			
T1	-	-----	-----	-----	-	-----	-	-----	-	-----	-----	-----
T2	41	22	95	5	0	0	0	20,9	1,1	0,0	0,0	0,0
	----		-----	-----	-----	-----	-----		-----			
T3	-	-----	-	-	-	-	-	-----	-	-----	-----	-----

T4	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

APPENDICE 2: Sottopopolazioni linfocitarie

Sono riportati di seguito, le sottopopolazioni linfocitarie dei 24 cani con tumore. nei 14 cani sottoposti a chemioterapia, sono inserite le misurazioni delle sottopopolazioni linfocitarie di tutti i tempi. Nei casi di cani con linfoma, è riportato anche il dato citofluorimetrico di marcatura del puntato linfonodale, che identifica l'immunofenotipo.

CASI 1 (osteosarcoma)
Cane, meticcio, M, 6 anni
Doxorubicina 30mg/m² + cisplatino 60mg/m²

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97 +/-8,61	1,61+/-0,49	61,56 +/-3,04		43,68 +/-6,39	0,91+/- 0,13	21,41 +/- 4,43	0,44+/- 0,15	13,36 +/- 7,11	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
T0	41,0	1,1	44,8	1,2	28,1	0,8	7,2	0,2	45,1	1,2	4,0
T1	53,0	0,2	57,9	0,2	37,6	0,1	10,4	0,03	33	0,1	3,3
T2	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T3	75,0	0,3	80,2	0,3	49,2	0,2	14,8	0,1	33,9	0,1	2,0

deceduto

CASO 2 (linfoma immunofenotipo B)
Cane, meticcio, M, 4 anni
Doxorubicina 30 mg/m²

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97 +/-8,61	1,61+/-0,49	61,56 +/-3,04		43,68 +/-6,39	0,91+/- 0,13	21,41 +/- 4,43	0,44+/- 0,15	13,36 +/- 7,11	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
T0	53,0	1,9	54,7	1,9	26,7	0,9	10,1	0,4	28	1,0	2,3
T1	70,0	1,1	79,9	1,2	45,6	0,7	22,5	0,3	3,8	0,1	2,3
T2	31,6	0,8	50,6	1,3	34,4	0,9	15,7	0,4	1,5	0,0	2,3
T3	38,3	1,3	76,3	2,7	41,8	1,5	12,7	0,4	0,1	0,0	3,8
T4	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T5	70,0	4,5	76,2	4,4	30,6	1,8	39,3	2,3	7,6	0,4	0,8

deceduto

LFN:	CD3	CD5 %	CD4 %	CD8 %	CD21 %	CD34 %
T0	1,2	1,4	1,2	0,1	98,3	0,0

CASO 3 (mastocitoma con metastasi al lfn tributario)
 cane, Labrador, F/S, 7 anni
 Clorambucile 2mg/m²

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97 +/-8,61	1,61+/-0,49	61,56 +/-3,04		43,68 +/-6,39	0,91+/-0,13	21,41 +/-4,43	0,44+/-0,15	13,36 +/-7,11	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
T0	80,5	1,0	79,0	0,9	17,1	0,2	16,8	0,2	7	0,1	1
T1	63,2	0,8	68,3	0,9	66,0	0,8	12,5	0,2	2,3	0,0	4
T2	13,1	0,2	24,8	0,4	22,7	0,4	6,0	0,1	1,4	0,0	4
T3	30,0	0,6	44,2	0,9	37,0	0,8	11,6	0,2	1,5	0,0	4
T4	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T5	59,0	1,4	61,7	1,5	52,0	1,2	17,2	0,4	8,6	0,2	3
T6	50,3	0,8	66,0	1,0	40,9	0,6	8,0	0,1	5,2	0,1	6
T7	70,0	1,5	70,3	1,5	44,5	1,0	7,2	0,2	1,6	0,0	5
T8	41,5	1,0	59,0	1,4	40,0	1,0	10,0	0,2	2,2	0,1	5
T9	56,0	0,4	61,2	0,4	46,0	0,3	11,4	0,1	1,8	0,0	3
T10	44,1	1,4	53,1	1,6	40,4	1,2	9,6	0,3	1,3	0,0	4
T11	44,2	0,6	49,2	0,6	36,0	0,5	10,6	0,1	2,3	0,0	5
T12	51,0	1,2	43,5	1,0	38,8	0,9	10,0	0,2	0,7	0,0	4,5

CASO 4 (emangiosarcoma)
 Cane, PT, M/I, 6
 anni
 Doxorubicina 30mg/m²

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97 +/-8,61	1,61+/-0,49	61,56 +/-3,04		43,68 +/-6,39	0,91+/-0,13	21,41 +/-4,43	0,44+/-0,15	13,36 +/-7,11	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
T0	78,0	1,2	84,7	1,4	27,7	0,4	18,6	0,3	16,1	0,3	1,3
T1	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T2	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T3	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T4	45,0	2,3	49,7	2,5	21,3	1,1	19,4	1,0	7,2	0,4	1,1
T5	73,0	1,4	76,6	1,4	7,7	0,1	8,4	0,2	2,1	0,0	0,5
T6	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T7	22,0	1,3	23,6	1,4	16,2	0,9	4,3	0,2	9,6	0,6	4,5
T8	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T9	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

deceduto

CASO 5 (adenocarcinoma sacchi anali)

Cane, Bassotto, M, 10 anni

oxaliplatino 30mg/m²

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
T0	82,0	1,6	84,1	1,6	53,6	1,0	6,53	0,1	8,8	0,2	10,0
T1	65,0	0,8	67,6	0,9	26,8	0,3	4,3	0,1	2,1	0,0	5,0
T2	45,0	0,9	48,7	1,0	22,0	0,4	4,0	0,1	2,0	0,0	5,0
T3	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T4	66,0	0,5	68,0	0,5	37,7	0,3	7,4	0,1	7,0	0,1	5,0
T5	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T6	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T7	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T8	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T9	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

CASO 6 (leucemia linfocitica cronica)

Cane, Dobermann, F/S, 9

anni

Clorambucile: 2 mg/m²

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
T0	69,3	10,3	27,5	4,1	5,6	0,8	40,0	6,0	0,3	0,0	0,1
T1	14,2	0,9	67,3	4,4	3,4	0,2	67,7	4,4	6,2	0,4	0,04
T2	80,0	3,8	95	4,5	6,0	0,3	75,0	3,5	10,4	0,5	0,1

Deceduto

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

T0 92,8 96,0 3,5 90,8 2,2 18,0

CASO 7 (leucemia linfocitica cronica)
 Cane, meticcio, M, 13 anni
 Clorambucile 2 mg/m²

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
T0	85,4	11,5	91,7	12,4	1,5	0,2	8,5	1,1	85,3	11,5	0,2
T1	78,8	21,3	88,3	23,8	5,6	1,5	5,8	1,6	78,8	21,3	0,9

Deceduto

CASO 8 (linfoma multicentrico tipo B)
 Cane, Dogue de Bordeaux, M/C, 7 anni
 protocollo: CHOP

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
T0	33,0	0,6	43,7	0,8	25,4	0,5	15,2	0,3	1,7	0,03	1,7
T1	38,4	0,4	42,6	0,5	15,8	0,2	17,4	0,2	0,7	0,01	1,0

deceduto

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

T0 10,7 4 2,2 4,6 40,7 5,2

CASO 9 (Carcinoma vescicale)
 Cane, Meticcio, F/S, 8 anni
 cisplatino 60 mg/m²

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
T0	45,6	0,2	67,2	0,3	45,1	0,2	15,2	0,1	10,9	0,1	2,0
T1	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T2	24,8	0,1	30,7	0,1	10,6	0,03	14,7	0,04	17,9	0,1	0,4

deceduto

CASO 10 (carcinoma mammario)

Cane, Sharpei, F/S, 6 anni

oxaliplatino 50 mg/m²

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
T0	40,0	0,7	16,6	0,3	19,1	0,3	2,9	0,1	26,7	0,5	3,0
T1	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T2	52,0	0,2	27,7	0,1	31,7	0,1	5,7	0,02	2,9	0,01	5,0

deceduto

CASO 11 (carcinoma mammario)

Cane, PT, F/S, 7

anni

oxaliplatino 50 mg/m²

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
T0	40,5	0,8	37,1	0,7	21,6	0,4	16,0	0,3	35,9	0,7	1,3
T1	15,8	0,1	19,1	0,1	15,2	0,1	7,7	0,1	16,8	0,1	2,0
T2	16,0	0,2	26,5	0,4	18,7	0,3	7,1	0,1	17,9	0,2	3,0
T3	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T4	80,0	0,8	83,8	0,8	39,3	0,4	24,9	0,2	9,0	0,1	1,1
T5	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
T6	82,0	3,4	86,3	3,5	37,5	1,5	17	0,7	11,5	0,5	2,1

CASO 12 (Carcinoma mammario)

Cane, Samoiedo, F/S, 6

anni

oxaliplatino 50mg/m²

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
T0	45,3	0,9	50,9	1,0	41,0	0,8	4,0	0,1	13,0	0,2	8,0
T1	48,2	0,6	60,6	0,7	34,1	0,4	22,9	0,3	14,1	0,2	1,3
T2	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

deceduto

CASO 13 (linfoma mediastinico, immunofenotipo T)
 Cane, Rhodesian, F, 10 anni
 NO
 CHEMIO

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
TO	20,0	0,4	35,5	0,8	32,8	0,7	8,8	0,2	4,0	0,1	3,5

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

TO 70,0 13,2 68,2 12,6 6,1 2,0

CASO 14 (linfoma cutaneo immunofenotipo T)
 Cane, Segugio Posavatz, F, 7 anni
 NO CHEMIO

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
TO	61,3	3,0	83,7	4,0	22,2	1,1	40,6	2,0	2,8	0,1	0,5

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

TO 34,9 35,7 23,5 13,0 33,4

CASO 15 (linfoma multicentrico immunofenotipo B)
 Cane, Pastore Tedesco, M, 6 anni
 NO CHEMIO

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
TO	73,0	0,5	82,7	0,6	41,4	0,3	36,0	0,2	3,0	0,02	1,5

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

TO 13,4 14,1 56,7 13,3 53,7 2,0

CASO 16 (Linfoma multicentrico immunofenotipo B)

Cane, Bovaro del Bernese, M,

NO

CHEMIO

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl 0,44+/- 0,15	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41		13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
TO	49,6	0,3	77,8	0,5	44,5	0,3	23,9	0,2	1,2	0,01	1,5

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

TO 3,3 3,2 2,7 13,5 68,2 1,5

CASO 17 (linfoma multicentrico immunofenotipo B)

Cane, meticcio, M, 6 anni

NO

CHEMIO

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl 0,44+/- 0,15	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41		13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
TO	52,2	0,4	54,2	0,4	40,0	0,3	23,6	0,2	1,3	0,01	1,5

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

TO 12,0 9,2 8,5 4,6 75,7 6,5

CASO 18 (linfoma multicentrico immunofenotipo B)

Cane, Beagle, M, 6 anni

NO

CHEMIO

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl 0,44+/- 0,15	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41		13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
TO	53,0	0,8	19,6	0,3	39,0	0,6	8,0	0,1	2,0	0,03	6,0

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

TO 93,0 2,5 40,0 31,0 1,7

CASO 19 (linfoma multicentrico immunofenotipo B)
 Cane, meticcio, M, 15 anni
 NO
 CHEMIO

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
TO	12,6	0,1	9,2	0,1	5,0	0,1	6,8	0,1	64,7	0,6	1

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

TO 45,0 46,0 20,0 21,0 4,0 0,0

CASO 20 (linfoma multicentrico immunofenotipo B)
 Cane, meticcio, F/S, 8 anni
 NO
 CHEMIO

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97	1,61+/-0,49	61,56		43,68	0,91+/-0,13	21,41	0,44+/-0,15	13,36	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
	+/-8,61		+/-3,04		+/-6,39		+/-4,43		+/-7,11		
TO	59,7	0,3	60,7	0,3	38,0	0,2	12,5	0,1	8,4	4,2	2,0

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

TO 29,9 31,8 29,5 6,2 63,7

CASO 21 (Linfoma mediastinico B)
 cane, Meticcio, M, 1,7 mesi
 protocollo: CHOP

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl 0,44+/- 0,15	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97 +/-8,61	1,61+/-0,49	61,56 +/-3,04		43,68 +/-6,39	0,91+/-0,13	21,41 +/-4,43		13,36 +/- 7,11	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
T0	43,8	1,3	54,7	1,6	43,3	1,3	24,0	0,7	2,3	0,1	1,9
T1	48,0	1,7	63,2	2,3	29,1	1,0	23,8	0,9	4,5	0,2	1,1
T2	59,3	0,6	61,4	0,7	26,0	0,3	21,0	0,2	1,6	0	1,5
T3	50,8	0,4	44,9	0,4	22,7	0,2	17,4	0,1	0,4	0	2,0
T4	50,3	0,2	53,5	0,2	26,8	0,1	26,3	0,1	0,9	0	1,0

deceduto

LFN CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

T0 5,7 2,2 4,1 5,1 64,6

CASO 22 (linfoma multicentrico T)
 Cane, Terranova, F, 4 anni e 7 mesi
 NO
 CHEMIO

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl 0,44+/- 0,15	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97 +/-8,61	1,61+/-0,49	61,56 +/-3,04		43,68 +/-6,39	0,91+/-0,13	21,41 +/-4,43		13,36 +/- 7,11	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
T0	37,0	1,4	34,0	1,3	33,3	1,2	16,5	0,6	2,0	0,1	2,0

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

T0 92,0 87,0 50,0 7,0 4,0 3,0

CASO 23 (linfoma multicentrico T)
 Cane, Pastore Tedesco, F, 5 anni
 NO
 CHEMIO

	CD3 %	CD3X10 ³ /μl	CD5 %	CD5X10 ³ /μl	CD4 %	CD4X10 ³ /μl	CD8 %	CD8X10 ³ /μl	CD21 %	CD21X10 ³ /μl	CD4/CD8
	74,97 +/-8,61	1,61+/-0,49	61,56 +/-3,04		43,68 +/-6,39	0,91+/-0,13	21,41 +/-4,43	0,44+/- 0,15	13,36 +/- 7,11	0,25+/-0,05	1,54+/-1,5
TO	45,0	1,2	44,0	1,1	20,0	0,5	17,00	0,4	1,0	0,03	1,2

LFN: CD3 CD5 * % CD4 * % CD8 * % CD21 * % CD34 %

TO 88,0 87,0 83,0 21,0 8,0 0,0

CASO 24 (tumore cerebrale) solo cTnl
 Cane, meticcio, F, 13 anni
 Temozolomide

NON EFFETTUATA CITOMETRIA

BIBLIOGRAFIA

- Adams Richard H. Farmacologia e terapeutica veterinaria, 2a edizione italiana a cura del prof. Carlo Beretta, 1999; 114
- Alexander J, Dainiak N, Berger HJ, et al. Serial assessment of doxorubicin cardiotoxicity with quantitative radionuclide angiography. *N Engl J Med* 1979; 300: 278-83.
- Azuma E, Nagai M, Qi J, et al. CD4+ T-lymphocytopenia in long-term survivors following intensive chemotherapy in childhood cancers. *Med Pediatr Oncol* 1998; 30: 40-45.
- Beckmann Coulter: Assay Manual of Access AccuTnITM REF 33340, Beckman Coulter for Troponin I assay (bulletin 171358F). Inc, 2004. pag. 1 - 18.
- Bexfield N. The Safe of citotoxic drugs in animal practice. *The European Journal of Companion Animal Practice*. Vol. 16 (1) April 2006; 51-62.
- Bonadonna G., Robustelli G., Valagussa P. *Medicina Oncologica*. Masson – 7° Edizione. 2003; 608 – 614.
- Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, Colombo N, Boeri M, Lamantia G, Civelli M, Peccatori F, Martinelli G, Fiorentini C, Cipolla CM. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation*. 2004;109: 2749 –2754.
- Chun R. Garrett LD, Vail DM: *Cancer Chemiotherapy*. In.: Withrow & MacEwen's, *Small Animal Clinical Oncology*. Ed. SJ Withrow, DM Vail, St Louis Missouri, Saunders Elsevier. 2007: 163 – 192.
- Ciftci O., Ozdemir I., Vardi N., Gurbuz N. Novel Platinum – N Heterocyclic carbene complex is more cardiotoxic than cis – platin in rats. *Human & Experimental Toxicology*. 2010; 1 – 8.
- Collins PO, Boa FG & Gaze DC. Measurement of cardiac troponins. *Annals of Clinical Biochemistry* 2001; 38: 423-449.
- Coudrey L. The troponins. *Arch Intern Med/Vol* 158; June 8, 1998: 1173-1180.
- Culmsee K and Nolte I. Flow cytometric and its application in small animal oncology. *Methods in Cell Science*, 2002; 24: 49-54.
- Emens LA, Machiels JP, Reilly RT et al. Chemotherapy: friend or foe to cancer vaccines?. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3: 77-84.

- Ettinger S.J., Feldmann E.C. Textbook of Veterinary Internal Medicine – sixth Edition, Volume 2. 2000; Cap 198: 940 – 948.
- Formelli F, Rossi C, Sensi ML et al. Potentiation of adoptive immunotherapy by cis-diamminechloroplatinum (II), but not by doxorubicin, on a disseminated mouse lymphoma and its association with reduction of tumor burden. *Int J Cancer* 1988; 42: 952-957.
- Gauthier M.J., Aubert I., Abrams – Ogg A., Woods J. P. and Biezle D. The Immunophenotype of Peripheral Blood Lymphocytes in Clinically Healthy Dogs and Dogs with Lymphoma in Remission. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 193 – 199.
- Gharib MI, Burnett AK. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. *Eur J Heart Fail* 2002; 4: 235-42.
- Grothey A. Oxaliplatin – safety profile: neurotoxicity. *Sem. Onc.* 2003 (30): 5 – 13.
- Harris J, Sengar D, Steward T et al. The effect of immunosuppressive chemotherapy on immune function in patients with malignant disease. *Cancer* 1976; 37: 1058-1069.
- Jensen S.A., Sorensen J.B. Risk factors and prevention of cardiotoxicity induced by 5 – fluorouracil or capecitabine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006.
- Kubota Y, Ohji H, Itoh K et al. Changes in cellular immunity during chemotherapy for testicular cancer. *Int J Urol* 2001; 8: 604-608.
- Kitchell B. – Chemotherapy: well known drugs for standard therapies and for new therapies – relazione al 58° congresso nazionale Scivac – oncologia veterinaria alle soglie del III Millennio. 7 – 9 marzo 2008.
- Kitchell B. – Chemotherapy: less known drugs for new frontiers– relazione al 58° congresso nazionale Scivac – oncologia veterinaria alle soglie del III Millennio. 7 – 9 marzo 2008.
- La Vecchia L, Mezzena G, Zannola L, Paccanaro M, Varotto L, Bonanno C & Ottlinger ME. Cardiac Troponin I as diagnostic and prognostic marker in severe heart failure. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2000; 19: 644-652.
- Mair J, Genser N, Morandelli D. Cardiac TroponinI in the diagnosis of myocardial injury and infarction. *Clin Chim Acta*, 1996; 245: 19-38.
- Marconato L., Del Piero F. : *Oncologia medica dei piccoli animali*. Ed. Poletto, 2005.

- Marconato L. Chemioterapia e terapia molecolare in oncologia veterinaria: stato dell'arte. *Veterinaria*, anno 21 – n. 3. Giugno 2007; 9 – 17.
- Marconato L. *Principi di chemioterapia oncologica*. 2009
- Meinardi MT, van der Graaf WT, van Veldhuisen DJ, et al. Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev* 1999; 25: 237-47.
- Morrow P.K., Hoff P.M. Does the addition oxaliplatin increase the risk of capecitabine – induced cardiotoxicity? *Nat. clin. Pract. Oncol.* 3, 2006; 77 – 77.
- Nelson R. W., Couto G.C. *Medicina interna del cane e del gatto*. Terza Edizione italiana a cura di Caldin Marco e Tommaso Furlanello. 2006; 1136 – 1144.
- O'brien PJ, Landt Y, Ladenson JH. Differential reactivity of cardiac and skeletal muscle from various species in a cardiac troponin I immunoassay. *Clinical Chemistry*, 1997; 43: 2333-2338.
- Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents. *Drug Safety* 2000; 22: 263-302.
- Periti P, Mini E. Immunomodulation by cancer chemiotherapeutic agents. *Chemioterapia* 1987; 6: 399-402.
- Raskin E.R, Meyer DJ. *Canine and feline cytology a color atlas and interpretation guide*. Second Edition, 2010; 421-430
- Rishniw M, Barr SC, Simpson KW, Winand NJ, Wootton JAM. Cloning and sequencing of the canine and feline cardiac troponin I genes. *Am. J. Vet. Res.*, 2004; 65: 53-58.
- Sara E, Kotsakis A, Souklakos J, et al. Post-chemotherapy lymphopoiesis in patients with solid tumors is characterized by CD4+ cell proliferation. *Anticancer Res* 1999; 19: 471-476.
- Shan K, Lincoff AM, Young JB. Anthracycline - induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med* 1996; 125: 47-58.
- Silber JH, Cnaan A, Clark BJ, et al. Enalapril to prevent cardiac function decline in long-term survivors of pediatric cancer exposed to anthracyclines. *J Clin Oncol* 2004; 22: 820-8.
- Sleeper MM, Clifford CA & Laster LL. Cardiac troponinI in the normal dog and cat. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2001; 15: 501-503.

- Spratt DP, Mellanby RJ, Drury N and Archer J. Cardiac troponin I: evaluation of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *Journal of Small Animal Practice* 2005; 46: 139-145.
- Tsavaris N, Kosmas C, Vadiaka M, et al. Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *Br J Cancer* 2002; 87: 21-27.
- Van den Belt-Dusebout AW, Nuver J, de Wit R, et al. Long-term risk of cardiovascular disease in 5-year survivors of testicular cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 467-75
- Van Rijswijk RE, Sybesma JP, Kater L. A prospective study of the changes in the immune status before, during, and after multiple-agent chemotherapy for Hodgkin's disease. *Cancer* 1983; 51:637-644.
- Walter CU, Biller BJ, Lana SE, Bachand AM, Dow SW. Effects of chemotherapy on immune response in dogs with cancer. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 342-347.
- Weiss DJ. Application of flow cytometric techniques for veterinary clinical haematology. *Vet Clin Pathol*, 2002; 31: 72-79.

