



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

CICLO XXXVI

EFFETTO DELLA CHEMIOTERAPIA
METRONOMICA SUL SISTEMA IMMUNITARIO
E SULLA PROGNOSI DI CANI AFFETTI DA
NEOPLASIA

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Gaetano DONOFRIO

Tutore:

Chiar.ma Prof.ssa Cecilia QUINTAVALLA

Dottorando: Kevin Pascal SPINDLER

Anni Accademici 2020/2021 – 2022/2023

Indice

ABSTRACT	4
PREFAZIONE	6
INTRODUZIONE	7
CENNI STORICI	7
MECCANISMI D'AZIONE	8
<i>Neo-vascolarizzazione</i>	8
<i>Cellule staminali neoplastiche</i>	9
<i>Dormienza tumorale</i>	9
<i>Sistema immunitario</i>	10
<i>Linfociti T regolatori</i>	10
APPLICAZIONI CLINICHE	11
FARMACI UTILIZZATI IN REGIME METRONOMICO	12
<i>Agenti chemioterapici</i>	12
<i>Antinfiammatori non steroidei</i>	13
<i>Talidomide</i>	13
MATERIALI E METODI	15
FASE PRELIMINARE	15
CRITERI DI INCLUSIONE NELLO STUDIO	16
VALUTAZIONE DEI PAZIENTI E FOLLOW-UP	16
PROTOCOLLO FARMACOLOGICO	17
<i>Agente chemioterapico</i>	17
<i>Antinfiammatorio non steroideo</i>	17
<i>Talidomide</i>	17
DETERMINAZIONE DEI LINFOCITI T REGOLATORI	18
<i>Esame emocromocitometrico</i>	18
<i>Isolamento e conta delle cellule mononucleate da sangue periferico</i>	18
<i>Analisi dei linfociti T regolatori mediante citofluorimetria a flusso</i>	19
<i>Reagenti</i>	20
ANALISI STATISTICA	21
RISULTATI	22

STUDIO PRELIMINARE	22
CHEMIOTERAPIA METRONOMICA: LO STUDIO	25
DISCUSSIONE	32
CONCLUSIONI.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	39

Abstract

Immunosuppressive regulatory T cells (Tregs) are part of the tumor microenvironment and contribute to the establishment of neoplastic tolerance, promoting tumor development and progression by dampening antitumor immune responses.

Metronomic chemotherapy (MC) is defined as the oral administration of low doses of chemotherapy on a continuous schedule of treatment, without extended drug-free breaks. MC has been shown to be a multitarget therapy and to act not only on neovascularization, cancer stem cells and tumor quiescence but also being able to interact with the patient's immune response to cancer, reversing the state of immune tolerance by selectively depleting the number of Tregs and impairing their functions.

The aim of this study was to evaluate the effects of MC consisting of daily administration of cyclophosphamide, meloxicam and thalidomide, on the absolute number of circulating Tregs in a population of patients with different cancer diseases, over the medium/long term.

It was hypothesized that during metronomic chemotherapy, the absolute number of circulating Tregs would progressively decrease; furthermore, good tolerability with few adverse effects was expected.

This prospective study included 29 canine cancer patients. To determine circulating Tregs we performed a complete blood count (CBC) and a cytofluorimetric examination of the lymphocytes. A blood sample was collected before and 15, 30, 90 and 180 days after the start of metronomic treatment (cyclophosphamide at 12,5 mg/m², meloxicam at 0,1 mg/kg and thalidomide at 3-6 mg/kg). The percentage of circulating CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs obtained by cytofluorimetry was then related to the absolute number of circulating lymphocytes to obtain the absolute number of circulating Tregs of each sample.

We found that the duration of MC administration has a statistically significant influence on the reduction of circulating Tregs absolute number, but not on the circulating Tregs percentage. Furthermore, in our cohort, tumor type or previous surgery did not seem to have any effect on the circulating Tregs absolute number.

Our patients did not develop any moderate or severe adverse effects, and long-term treatment was well tolerated.

This is the first time that the effect of the metronomic combination of cyclophosphamide, meloxicam, and thalidomide on circulating Tregs is evaluated in a canine population with cancer, showing a reduction in their absolute number over time. This is an interesting result that should motivate to

gather more knowledge about the interactions between immune system and different tumor types, in order to be able to use MC in a more targeted way. Furthermore, flow cytometry is a readily available tool that could be of great value in daily clinical practice to analyze the pattern of circulating Tregs during MC to detect early tumor progression.

Prefazione

La chemioterapia metronomica (MC – *Metronomic Chemotherapy*), proposta per la prima volta nel 2000 da Hanahan et al., può essere definita come la somministrazione continuativa per via orale di farmaci chemioterapici a bassi dosaggi; questo comporta una notevole riduzione dei potenziali effetti collaterali (Hanahan et al., 2000; Bocci et al., 2003; Kerbel and Kamen, 2004). Storicamente, la MC è stata impiegata come terapia palliativa qualora fossero stati esauriti tutti i trattamenti convenzionali (Gaspar et al., 2018). Le ultime evidenze in campo umano suggeriscono, però, un suo potenziale utilizzo anche in regime neoadiuvante e non soltanto come palliazione (Dellapasqua et al., 2011; Rabanal et al., 2017).

In ambito veterinario questa terapia presenta diversi vantaggi (Emmenegger et al., 2004; Kerbel, 2007; Koumarianou et al., 2014; Gaspar et al., 2018):

- migliore tollerabilità e minore necessità di farmaci di supporto
- basso costo
- comodità per i proprietari che trattano i loro animali a casa, causando anche meno stress all'animale
- minore probabilità di indurre farmacoresistenza e possibilità di combinazione con altre terapie

Attualmente, a fronte di un progressivo sviluppo in campo umano, i lavori pubblicati sulla MC in medicina veterinaria sono ancora poco numerosi. L'obiettivo del presente studio è stato l'approfondimento delle conoscenze attuali sull'utilizzo della MC nel cane, focalizzando l'attenzione sui meccanismi alla base del suo funzionamento; in particolare è stato valutato l'andamento dei linfociti T regolatori (Tregs) circolanti (responsabili dell'evasione dall'immunosorveglianza dei tumori) in cani affetti da diversi istotipi tumorali sottoposti a trattamenti di MC. È stato ipotizzato che in corso di chemioterapia metronomica il numero assoluto dei linfociti T regolatori circolanti si riducesse progressivamente nelle fasi in cui la malattia non era in progressione; inoltre, si prospettava una buona tollerabilità della terapia da parte degli animali e la comparsa di pochi effetti avversi.

Questo studio è stato preceduto da una fase preliminare necessaria per la messa a punto della tecnica citofluorimetrica per la determinazione delle percentuali di Tregs circolanti e per verificare se ci fosse concordanza con gli studi precedentemente pubblicati in medicina veterinaria.

Introduzione

Cenni storici

Il cancro rappresenta da sempre una sfida per i medici di tutto il mondo. I progressi della medicina veterinaria hanno permesso ai cani di vivere più a lungo, aumentando di conseguenza l'incidenza delle malattie legate all'età, incluso il cancro (Paoloni and Khanna, 2007; Pierini et al., 2012). La chemioterapia convenzionale è stata il cardine della terapia antitumorale sistemica per oltre 50 anni. La maggior parte dei protocolli chemioterapici, in medicina umana come in medicina veterinaria, prevede la somministrazione di uno o più agenti citotossici somministrati ad alti dosaggi seguendo il concetto di dose massima tollerata (MTD – *Maximum-Tolerated Dose*). Poiché le cellule neoplastiche si dividono più rapidamente rispetto ai tessuti sani, la chemioterapia MTD ha lo scopo di eliminare il maggior numero di cellule neoplastiche al fine di abbassare il carico tumorale, senza creare eccessivi effetti collaterali all'organismo. Un aspetto critico di tutti i protocolli di chemioterapia MTD è la necessità di intervalli tra le sedute di trattamento proprio per consentire il recupero dei tessuti più sensibili ai farmaci, in particolare i precursori del midollo osseo e le cellule epiteliali gastrointestinali. Questo approccio, però, consente anche il recupero di una parte delle cellule neoplastiche e può portare alla progressione o alla recidiva del tumore, allo sviluppo di metastasi o alla farmacoresistenza. Sebbene la chemioterapia convenzionale sia stata associata ad un significativo aumento della sopravvivenza per molti tumori, raramente permette di ottenere un controllo permanente della malattia, soprattutto in presenza di malattia metastatica (Biller, 2014). Negli ultimi decenni la ricerca ha portato ad una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari all'origine delle metastasi tumorali e della farmacoresistenza. Nel 2000 Fidler ed Ellis affermarono che “il cancro è una malattia cronica e dovrebbe essere trattato come le altre patologie croniche” (Fidler and Ellis, 2000). Sempre nel 2000, diversi autori hanno evidenziato una serie di elementi decisivi per l'efficacia della chemioterapia antineoplastica (Browder et al., 2000; Hanahan et al., 2000; Klement et al., 2000) che includono l'eterogeneità dinamica e l'instabilità delle cellule tumorali, l'azione protettiva del microambiente tumorale e la soppressione della risposta immunitaria antitumorale. La presa di coscienza a riguardo ha consentito lo sviluppo di nuovi approcci alla terapia del cancro, come ad esempio la chemioterapia metronomica (Hanahan and Weinberg, 2000; Biller, 2014). Fu Douglas Hanahan a nominare questa terapia con il termine “metronomica”, facendo riferimento soprattutto allo schema che consiste nella somministrazione cronica, di dosi di farmaci equamente distanziate e senza periodi di riposo (Hanahan et al., 2000). Questo nuovo concetto

prevedeva la possibilità di trattare tumori che non rispondevano più alla terapia tradizionale (Scharovsky et al., 2009).

Meccanismi d'azione

Mentre in corso di chemioterapia tradizionale il principale meccanismo d'azione è un effetto antitumorale diretto, legato all'induzione dell'apoptosi o comunque all'azione citotossica diretta sulle cellule tumorali, con la MC l'effetto ricercato è quello indiretto, che agisce sul microambiente tumorale, in particolar modo inibendo l'angiogenesi tumorale. Nel corso del suo sviluppo, la MC si è inoltre dimostrata una terapia *multitarget*: oltre all'azione sulla neo-vascolarizzazione, interagisce con le cellule staminali tumorali, interviene nella dormienza tumorale e sulla risposta immunitaria del paziente nei confronti del cancro (Hanahan et al., 2000; Pasquier et al., 2010; Gaspar et al., 2018; Cazzaniga et al., 2021).

Neo-vascolarizzazione

Il processo di angiogenesi, ovvero lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni da vasi preesistenti, è fondamentale per la crescita tumorale. Il tumore è in grado di stimolare sia la neo-angiogenesi sia la vasculogenesi, definita come la formazione di nuovi vasi sanguigni da cellule precursori derivate dal midollo osseo, compresi i precursori endoteliali circolanti (Asahara et al., 1997; Bertolini et al., 2006; Biller, 2014). Poiché l'angiogenesi è di fondamentale importanza per la sua sopravvivenza, il tumore riesce ad alterare il normale equilibrio tra le molecole pro-angiogeniche e anti-angiogeniche, fenomeno noto come *switch* angiogenico.

In corso di MC, le cellule endoteliali della vascolarizzazione tumorale vengono direttamente colpite dagli agenti chemioterapici (Mutsaers, 2009; Mross and Steinbild, 2012; Loven et al., 2013; Gaspar et al., 2018) attraverso l'induzione selettiva dell'apoptosi e l'inibizione selettiva della loro proliferazione e migrazione (Bocci et al., 2002; Blansfield et al., 2008; Pasquier et al., 2010; Gaspar et al., 2018). Le stesse cellule vengono anche indirettamente influenzate tramite l'up-regolazione di fattori anti-angiogenici (ad esempio, l'endostatina e la trombospondina-1) e la down-regolazione di fattori pro-angiogenici (ad esempio, il fattore di crescita vascolare endoteliale [VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*] ed il fattore di crescita dei fibroblasti [FGF – *Fibroblast Growth Factor*]) (Loven et al., 2013; Biller, 2014; Gaspar et al., 2018).

La MC è inoltre in grado di interferire con la vasculogenesi: in questo caso il bersaglio sono i precursori endoteliali circolanti, la loro vitalità e capacità di mobilitazione (Pasquier et al., 2010; Loven et al., 2013; Gaspar et al., 2018).

Cellule staminali neoplastiche

Le cellule staminali tumorali che risiedono all'interno del microambiente tumorale contribuiscono alla de-differenziazione cellulare, all'eterogeneità tumorale, all'invasione, alla metastatizzazione (Reya et al., 2001; Singh and Settleman, 2010; Simsek et al., 2019) e sono state considerate la principale fonte di fenomeni di resistenza del tumore alla chemioterapia convenzionale e alla radioterapia (Vives et al., 2013; Benazzi et al., 2014; Malik et al., 2014; Gaspar et al., 2018). Queste cellule hanno un elevato potere angiogenico, sono in grado di produrre elevati livelli di VEGF sia in condizioni normali sia in condizioni ipossiche (Ribatti, 2012); inoltre hanno la capacità di auto-rinnovamento mediante sistemi di riparazione del DNA (Reya et al., 2001; Romiti et al., 2013; Biller, 2014). Nonostante le limitate evidenze, la MC sembrerebbe ridurre la popolazione di cellule staminali tumorali inibendole direttamente e tramite la sua azione anti-angiogenica (Kerbel and Shaked, 2017).

Dormienza tumorale

La dormienza tumorale si verifica nella fase iniziale della progressione del tumore (Pasquier et al., 2010; Gaspar et al., 2018), prima che si sviluppino le condizioni adatte a sostenerne la proliferazione, e anche in un secondo momento, durante la fase di remissione post trattamento (Hanahan and Folkman, 1996; Bahl and Bakhshi, 2012; Gaspar et al., 2018). In questa fase le cellule tumorali non si replicano, ma restano quiescenti, anche molto a lungo, sopravvivendo in attesa delle giuste condizioni per riprendere a proliferare. È regolata dal sistema immunitario, con un equilibrio dinamico tra proliferazione cellulare e morte per apoptosi (quiescenza immunologica) o insufficiente apporto di sangue (quiescenza angiogenica). Esistono almeno tre diversi meccanismi che regolano la dormienza tumorale: la dormienza intrinseca (le cellule sono in arresto mitotico, quindi meno responsive alla chemioterapia), l'immunosorveglianza (le cellule sono in grado di sfuggire al sistema immunitario) e la dormienza estrinseca (*switch* dall'effetto angiogenico a quello non angiogenico) (Phan and Croucher, 2020). La dormienza può insorgere sia a livello di tumore primario sia delle sue metastasi (Pasquier et al., 2010; Gaspar et al., 2018).

Si ipotizza che al bilanciamento tra proliferazione tumorale ed apoptosi contribuiscano in modo fondamentale il microambiente tumorale, l'impedimento della vascolarizzazione (dormienza angiogenica) e la sorveglianza immunitaria (Páez et al., 2012; Simsek et al., 2019). Diversi studi evidenziano la capacità della MC di indurre una quiescenza angiogenica, in particolare attraverso l'up-regolazione di fattori anti-angiogenici come la trombospodina-1 e la down-regolazione di fattori pro-angiogenici come il VEGF (Natale and Bocci, 2018; Simsek et al., 2019).

Sistema immunitario

Le neoplasie tendono a trasformare l'ambiente circostante per creare un microambiente vitale, modificando il sistema immunitario dell'ospite e stabilendo la cosiddetta *tolleranza immunitaria*. Ripristinare e potenziare la risposta immunitaria antitumorale è un altro meccanismo d'azione della MC (Ménard et al., 2008; Simsek et al., 2019).

I linfociti T regolatori e le cellule soppressorie di origine mieloide (MDSC – *Myeloid-derived suppressor cells*) sono cellule di particolare importanza nel limitare l'infiammazione patologica in condizioni sia fisiologiche sia tumorali. Queste cellule sopprimono efficacemente le risposte immunitarie antitumorali e sono presenti ad alti livelli nei pazienti oncologici con neoplasie maligne (Biller, 2014), contribuendo significativamente alla tolleranza immunitaria (Finn, 2012; Umansky and Sevko, 2013; Gaspar et al., 2018).

Linfociti T regolatori

I linfociti T sono mediatori dell'immunità. All'inizio degli anni '70, è stata ipotizzata l'esistenza di cellule T soppressorie in grado di inibire le altre cellule T (Gershon et al., 1972). Nel 1995 Sakaguchi et al. hanno scoperto una nuova sottopopolazione di cellule T soppressorie, identificando una popolazione di cellule T CD4⁺ (Cluster di Differenziazione) che esprimevano numerose catene alfa del recettore dell'interleuchina-2 (CD25); queste cellule sono ora denominate Tregs (Sakaguchi et al., 1995). Il Foxp3 (*forkhead box P3*) è un fattore di trascrizione, regolatore critico dello sviluppo e del funzionamento delle cellule T regolatorie CD4⁺CD25⁺ (Ohkura et al., 2012). Ad oggi, il Foxp3 è uno dei marcatori più affidabili per la determinazione dei Tregs (Zhao et al., 2010; Chen et al., 2016).

Per riuscire a mantenere l'omeostasi immunitaria esistono diversi meccanismi regolatori in grado di prevenire disordini autoimmuni e moderare l'infiammazione indotta da agenti patogeni e insulti ambientali. I Tregs vengono considerati come i principali mediatori della tolleranza periferica, inibendo l'auto-reattività dei linfociti maturi a livello degli organi linfoidi secondari e dei tessuti periferici. Sebbene abbiano un ruolo fondamentale nella prevenzione delle malattie autoimmuni, come il diabete di tipo 1 (Sakaguchi et al., 2001; Shevach et al., 2006; Vignali et al., 2008), e nel limitare le malattie infiammatorie croniche, come l'asma e le malattie infiammatorie intestinali (IBD – *Inflammatory Bowel Disease*) (Coombes et al., 2005; Xystrakis et al., 2006; Vignali et al., 2008), sono anche in grado di instaurare la tolleranza immunitaria nei confronti dei tumori (Kretschmer et al., 2006; Vignali et al., 2008).

Esistono due classi di Tregs: i Tregs di derivazione timica o *naive* (nTregs) ed i Tregs inducibili (iTregs) (Ha, 2009; Gaspar et al., 2018). Sono le cellule tumorali ad indurre la generazione dei iTregs dai nTregs, attraverso il contatto cellula-cellula e la produzione di citochine antinfiammatorie,

soprattutto dell'interleuchina-10 (IL-10), interleuchina-35 (IL-35) ed del fattore di crescita trasformante- β (TGF- β) (Ha, 2009; Josefowicz et al., 2012; Chen et al., 2016; Gaspar et al., 2018). I linfociti CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ si accumulano all'interno del sito tumorale (Pasquier et al., 2010; Josefowicz et al., 2012; Bahl and Bakhshi, 2012; Koumarianou et al., 2014; Madondo et al., 2016; Gaspar et al., 2018) e sopprimono l'attività immunitaria tumore-specifica data dalle cellule T citotossiche (Tcyt) e dalle cellule T helper (Th) e l'attività immunitaria tumore-non-specifica data dalle cellule T effettrici (Teff) come le natural killer (NK) e le cellule T natural killer (NKT) (Bahl and Bakhshi, 2012; Mross and Steinbild, 2012; Gaspar et al., 2018), inibendo anche la maturazione delle cellule dendritiche (DC) (Tanaka et al., 2009; Gaspar et al., 2018).

La MC può invertire lo stato di tolleranza immunitaria riducendo selettivamente il numero di Tregs e compromettendo le loro funzioni, aumentando così la potenza delle Teff (Madondo et al., 2016; Gaspar et al., 2018), man mano che la funzione delle DC viene migliorata, promuovendo quindi una presentazione dell'antigene più efficace (Tanaka et al., 2009; Madondo et al., 2016; Gaspar et al., 2018). La riduzione dei Tregs in corso di MC è attribuita principalmente all'abbassamento delle concentrazioni intracellulari di ATP rispetto ai Teff, che compromette la disintossicazione dai metaboliti del chemioterapico somministrato (Zhao et al., 2010; Gaspar et al., 2018).

Applicazioni cliniche

Storicamente, la MC, proprio a causa della mancata azione citotossica diretta, viene consigliata in medicina veterinaria come trattamento palliativo. Gli obiettivi per cui viene proposta possono però essere differenti, in particolare può rappresentare:

- Trattamento di prima linea nei pazienti con diagnosi di malattia avanzata e/o incurabile; in questo caso rappresenta un'alternativa più sicura rispetto alla chemioterapia tradizionale e potenzialmente altrettanto efficace (Lana et al., 2007; Loven et al., 2013; Gaspar et al., 2018).
- Terapia di consolidamento, a seguito di chemioterapia convenzionale adiuvante o neoadiuvante, con lo scopo di prolungare lo stato clinico di remissione acquisito in pazienti ad alto rischio di recidiva, (Loven et al., 2013), oppure da sola come terapia adiuvante dopo intervento chirurgico e/o radioterapia al fine di eliminare eventuali cellule tumorali residue o micro-metastasi (Gaspar et al., 2018).
- Terapia di mantenimento, in sostituzione a precedenti protocolli dose-intensi, indipendentemente dalla risposta ottenuta, con l'intento di offrire una migliore qualità di vita (Loven et al., 2013; Gaspar et al., 2018). Dieci anni fa è stata introdotta una nuova modalità di trattamento, il regime di *chemo-switch*, che prevede l'uso della MC dopo la chemioterapia

alla dose massima tollerata. Il *chemo-switch* come approccio di mantenimento può essere di beneficio clinico per i pazienti con bassa carica tumorale (Bellmunt et al., 2010; Malik et al., 2014; Gaspar et al., 2018).

Farmaci utilizzati in regime metronomico

In regime di chemioterapia metronomica viene di solito impiegata una combinazione di farmaci di diverse classi con proprietà anti-angiogeniche, immunostimolanti e pro-apoptotiche (Mutsaers, 2009). L'associazione più comunemente utilizzata nella pratica clinica è quella di ciclofosfamide, talidomide e un antinfiammatorio non steroideo.

Agenti chemioterapici

La ciclofosfamide, un agente alchilante, è di gran lunga l'agente chemioterapico più studiato ed utilizzato nei protocolli di chemioterapia metronomica. Ad alto dosaggio (250-300 mg/m²), da sola o in associazione con altri farmaci citotossici (Penel et al., 2012; Gaspar et al., 2018), ne viene sfruttato l'effetto citotossico diretto nella gestione di diverse patologie neoplastiche, quali diverse forme di linfoma, alcuni sarcomi, mentre in regime metronomico (mediamente 10-15 mg/m²) dimostra buone proprietà anti-angiogeniche e immunomodulanti. Sembra in grado di stimolare la produzione di trombospondina-1 (Hamano et al., 2004; Shaked et al., 2005; Damber et al., 2006) e di ridurre il livello di citochine immunosoppressive, come TGF- β , IL-10 e IL-2 (Matar et al., 2001, 2002; Sharabi and Ghera, 2010), stimolare le cellule NKT (Liu et al., 2007; Sharabi and Ghera, 2010), la maturazione delle cellule dendritiche (Wada et al., 2009; Sharabi and Ghera, 2010) e favorire la sopravvivenza delle cellule T memoria (Hermans et al., 2003; Zacarías Fluck et al., 2007; Penel et al., 2012).

Mentre il dosaggio dose-intenso è ormai standardizzato, c'è grande variabilità per quello utilizzato nei protocolli metronomici descritti per il cane; è riportato il suo impiego a dosaggi da 7 a 25 mg/m², somministrata una volta al giorno oppure a giorni alterni per via orale (Lana et al., 2007; Rasmussen et al., 2017; Elmslie et al., 2008; Burton et al., 2011; Marchetti et al., 2012; Mitchell et al., 2012; Bracha et al., 2014; Spugnini et al., 2014; London et al., 2015; Wendelburg et al., 2015; Cancedda et al., 2016; Finotello et al., 2017; Gaspar et al., 2018). Recentemente, Denies et al. hanno dimostrato una riduzione significativa delle percentuali di Tregs in corso di MC con un dosaggio di ciclofosfamide pari a 12,5 mg/m² (Denies et al., 2017). Un altro studio ha dimostrato che la somministrazione giornaliera di ciclofosfamide a bassi dosaggi (12,5-15 mg/m²) come singolo agente è in grado di ridurre il numero assoluto di linfociti T regolatori circolanti in corsi di neoplasia (Burton et al., 2011).

Oltre alla ciclofosfamide, altri farmaci come il clorambucile (4 mg/m² o 0,2 mg/kg, una volta al giorno) (Leach et al., 2012; Schrempp et al., 2013) e la lomustina (2,8 mg/m², una volta al giorno) (Tripp et al., 2011) sono stati usati in diversi lavori condotti sul cane, ma il loro impiego è più limitato rispetto a quello della ciclofosfamide.

Antinfiammatori non steroidei

I mediatori dell'infiammazione sembrano giocare un ruolo importante nella crescita e sopravvivenza delle cellule tumorali. La ciclossigenasi (Cox)-1, enzima coinvolto direttamente nella regolazione dei processi infiammatori dell'organismo, è espressa fisiologicamente nei tessuti normali e nei tumori maligni del cane, mentre l'isoforma Cox-2 è normalmente assente nelle cellule normali (Queiroga et al., 2005; Gaspar et al., 2018), essendo indotta solo nelle cellule infiammatorie e nei tumori da citochine e promotori tumorali (Masferrer et al., 2000; Gaspar et al., 2018). La Cox-2 è espressa anche all'interno della neo-vascolarizzazione tumorale e nelle cellule tumorali, dove volge un effetto sia pro-angiogenico sia immunomodulatorio (Rasmussen et al., 2017) ed è sovra-espressa in molti tumori canini (p.e. neoplasie mammarie, melanoma e mastocitoma) (Queiroga et al., 2005; Pires et al., 2010; Prada et al., 2012). Entrambe le molecole possono essere inibite dai tradizionali farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) (Masferrer et al., 2000; Gaspar et al., 2018). Il FANS più utilizzato e più studiato è il piroxicam (0,3 mg/kg una volta al giorno), inibitore non specifico delle Cox-1 e Cox-2 (Knapp et al., 1994; Chon et al., 2012; Gaspar et al., 2018). Come alternativa viene frequentemente utilizzato il meloxicam (0,1 mg/kg una volta al giorno) (Milevoj et al., 2022), inibitore non specifico che agisce maggiormente sulla Cox-2 rispetto alla Cox-1. A differenza del piroxicam, il meloxicam è registrato anche per uso veterinario e la sua formulazione liquida ne rende agevole la somministrazione quotidiana.

Talidomide

La talidomide è stata sintetizzata per la prima volta nel 1954 ed è stata utilizzata in Europa come farmaco ipno-sedativo e antiemetico non barbiturico per la nausea mattutina nell'uomo, soprattutto nelle donne in gravidanza (Teo et al., 2004; Pierini et al., 2020). Nel 1961 si scoprì che la talidomide aveva effetti teratogeni e fu quindi ritirata dal mercato (Sheskin, 1965; Pierini et al., 2020). Per questo motivo il profilo di sicurezza della talidomide non è stato completamente determinato fino al 1998 (Calabrese and Fleischer, 2000; Pierini et al., 2020) e da allora sono stati condotti diversi studi sul suo potenziale impiego per il controllo di patologie infiammatorie e oncologiche, sfruttando proprio i suoi effetti anti-angiogenici. Ha mostrato infatti una promettente attività antitumorale in diverse neoplasie ed è stato proposto come farmaco di scelta nel mieloma multiplo (Singhal et al., 1999; Govindarajan et al., 2000; Marx et al., 2001; Patt et al., 2005; Pierini et al., 2020). Il suo meccanismo

d'azione non è ancora stato completamente chiarito, anche se è noto che possiede proprietà immunomodulanti, antinfiammatorie e anti-angiogeniche, in particolare attraverso l'inibizione dell'espressione del VEGF (Páez et al., 2012; Gaspar et al., 2018) e del fattore di necrosi tumorale (TNF – Tumor Necrosis Factor) α circolante (Queiroga et al., 2005; Gaspar et al., 2018). Sembra avere effetto sinergico con la ciclofosfamide.

Il dosaggio della talidomide in corso di chemioterapia metronomica, è generalmente empirico, e negli studi pubblicati sono riportati dosaggi da 2 e 26 mg/kg/giorno o 100-400 mg/cane/giorno (Finotello et al., 2017; Polton et al., 2018; Ekena et al., 2018; Pierini et al., 2020).

Materiali e metodi

Lo studio è stato sottoposto al vaglio del Comitato Etico per la Sperimentazione Animale (CESA), istituito ai sensi della legge regionale 01 agosto 2002, n. 20, che ha espresso parere etico favorevole alla sua esecuzione, che non prevedeva procedure sperimentali ma solo utilizzo di matrici biologiche (sangue) da soggetti sottoposti a protocolli di chemioterapia metronomica tradizionale. Per acconsentire all'inclusione nello studio i proprietari di tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato all'utilizzo delle matrici biologiche prelevate dai propri animali per fini diagnostici e terapeutici. Inoltre, i proprietari sono stati correttamente istruiti per la manipolazione e somministrazione casalinga sicura dei diversi farmaci.

Fase preliminare

Questa fase si è resa necessaria al fine di mettere a punto la tecnica citofluorimetrica per la determinazione delle percentuali di Tregs circolanti e per verificare se ci fosse concordanza con gli studi precedentemente pubblicati in medicina veterinaria. In fase di arruolamento i pazienti sani sono stati definiti tali in seguito ad una anamnesi approfondita con esame fisico. Di questi pazienti sono state utilizzate le matrici ematologiche prelevate per le indagini preoperatorie di routine (p.e. ovarioisterectomia) oppure per esami annuali di check-up, evitando così ulteriori prelievi di sangue, nel rispetto del benessere dell'animale.

Successivamente, sono stati arruolati cani affetti da neoplasia seguiti presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) di Parma, per patologie tumorali di diverso tipo e non sottoposti a protocolli di chemioterapia metronomica, dai quali è stato ottenuto un campione di sangue prima che fossero sottoposti a chirurgia per l'asportazione del tumore o a chemioterapia dose-intensa. Questo gruppo è servito come controllo per valutare la variazione delle percentuali di Tregs circolanti in una popolazione neoplastica rispetto a una sana, nonché per ottimizzare l'impiego dei campioni della popolazione in esame e non rischiare la perdita prima della perfetta messa a punto della tecnica. I criteri di inclusione per questi soggetti erano la diagnosi tumorale documentata mediante istologia e/o citologia della neoformazione. Pazienti affetti da neoplasia linfoproliferativa, trattati chirurgicamente per resezione neoplastica (quindi con malattia tumorale solo microscopica), oppure trattati con corticosteroidi, chemioterapici in regime dose-intenso o metronomico, farmaci immunosoppressori, o affetti da concomitanti patologie immunomediate sono stati esclusi.

Sul sangue di queste due popolazioni canine è stato effettuato un esame citofluorimetrico per la determinazione delle percentuali di Tregs circolanti.

Criteri di inclusione nello studio

I pazienti del presente studio prospettico sono stati inclusi e trattati presso l'OVUD dell'Università di Parma dal 10 novembre 2020 al 10 aprile 2023. Lo studio si è concluso il 10 novembre 2023.

Sono stati arruolati cani sottoposti a trattamento MC perché:

- affetti da neoplasia in fase avanzata/terminale
- affetti da neoplasia cui è stato rifiutato il trattamento d'elezione (chirurgia, chemioterapia MTD, radioterapia)
- trattati come terapia di consolidamento o di mantenimento.

I pazienti affetti da neoplasia linfoproliferativa, oppure in terapia con corticosteroidi o farmaci immunosoppressori o con un follow-up inferiore a 15 giorni sono stati esclusi.

L'uso della chemioterapia tradizionale o del FANS prima della MC è stato consentito qualora fosse stato effettuato un corretto *washout* di rispettivamente almeno 3 settimane e 3 giorni.

Valutazione dei pazienti e follow-up

I pazienti inclusi sono stati sottoposti a stadiazione clinica mediante esame fisico, esame emocromocitometrico, chimica sierica, esame ecografico dell'addome e radiografico del torace in tre proiezioni e/o tomografia computerizzata (TC). Per ciascun paziente è stata ottenuta la diagnosi citologica e/o istologica del tumore primario (con l'ausilio dell'immunoistochimica quando necessaria) e successivamente impostata la MC. Un giorno prima di iniziare la MC (T_0) e ai tempi previsti dallo studio è stato utilizzato il sangue prelevato per i controlli di routine per eseguire l'esame citofluorimetrico per la determinazione delle percentuali di Tregs circolanti.

I controlli ematologici sono stati stabiliti a 15 (T_1), 30 (T_2), 90 (T_3) e 180 (T_4) giorni, in concomitanza con uno dei normali controlli eseguiti per valutare la tossicità sistemica della terapia, e consistevano in esame fisico, emocromocitometrico e citofluorimetrico di controllo, con raccolta e trascrizione dell'anamnesi corrente nella cartella clinica del singolo paziente.

Per la determinazione dei Tregs sono stati eseguiti in sequenza: l'esame emocromocitometrico, l'isolamento delle cellule mononucleate mediante centrifugazione del campione ed il congelamento del campione cellulare entro un'ora del prelievo. Al momento dell'analisi i campioni venivano scongelati, preparati ed analizzati tramite il citofluorimetro (vedi paragrafo "Determinazione dei linfociti T regolatori").

Tutti i soggetti sottoposti a MC sono stati rivalutati sia clinicamente sia da un punto di vista ematologico con cadenza mensile fino al decesso o per almeno 6 mesi dall'inizio della terapia. Durante i controlli, oltre alla valutazione della tollerabilità della terapia, ogni paziente è stato visitato per valutarne lo stato generale e l'eventuale progressione della malattia tumorale.

Ogni effetto avverso legato alla MC è stato classificato secondo il *Veterinary Cooperative Oncology Group Common Terminology Criteria for Adverse Events* (VCOG-CTAE) v2 (LeBlanc et al., 2021) e ogni sospensione e/o variazione della terapia è stata annotata nella scheda del paziente.

Protocollo farmacologico

Il protocollo metronomico è stato proposto per un periodo minimo di 6 mesi, al termine del quale ciascun soggetto è stato sottoposto a rivalutazione clinica e di diagnostica per immagini e, se la malattia appariva stabile o in lenta progressione, la terapia è stata prolungata di ulteriori 3 mesi, fino a un massimo di 1 anno, al termine del quale veniva interrotta.

Per quanto riguarda la tolleranza alla terapia, sono stati fissati controlli mensili clinici ed ematologici (emocromo e chimica sierica contenente i parametri di funzionalità renale, transaminasi, bilirubina, proteina totali, albumine, parametri muscolari, colesterolo e trigliceridi).

Agente chemioterapico

In questo studio è stato scelto come agente immunomodulatore la ciclofosfamide (Endoxan®, Baxter Oncology GmbH, Germania), impiegata al dosaggio più comunemente utilizzato nella pratica clinica (12,5 mg/m²) (Burton et al., 2011; Denies et al., 2017), somministrata per via orale ogni 24 ore al mattino, formulata da una farmacia autorizzata in capsule con dosaggio corrispondente a quello necessario per ogni paziente.

Antinfiammatorio non steroideo

Quando le condizioni cliniche dei pazienti lo permettevano (assenza di malattia renale cronica, patologie gastroenteriche) veniva associato l'uso del FANS. È stato utilizzato il meloxicam alla dose antinfiammatoria di 0,1 mg/kg (Meloxoral®, Dechra, Italia) per via orale ogni 24 ore, a stomaco pieno e senza la necessità di somministrare un gastroprotettore.

Talidomide

La talidomide è stata somministrata alla dose di 3-6 mg/kg per via orale ogni 24 ore alla sera. La posologia è stata stabilita arbitrariamente sulla base dei lavori precedentemente pubblicati (Finotello et al., 2017; Polton et al., 2018; De Campos et al., 2018) e aggiustata in base alla tolleranza del soggetto.

Determinazione dei linfociti T regolatori

Per la determinazione dei Tregs sono stati eseguiti in sequenza l'esame emocromocitometrico, l'isolamento delle cellule mononucleate ed il congelamento del campione cellulare entro un'ora del prelievo. Al momento dell'analisi i campioni venivano scongelati, preparati ed analizzati tramite il citofluorimetro.

Esame emocromocitometrico

L'esame è stato eseguito su sangue intero prelevato e posto in provette Vacutest® contenente K₃-EDTA tramite l'ausilio del contaglobuli CELL-DYN 3500 (Abbott, USA) in un primo tempo, poi sostituito da ADVIA2120i (Siemens Healthineers, Germania). La formula leucocitaria è stata in ogni caso confermata dalla lettura differenziale dello striscio ematico.

Isolamento e conta delle cellule mononucleate da sangue periferico

Le cellule mononucleate nel sangue periferico (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) sono state separate dalle altre sottopopolazioni cellulari e isolate mediante gradiente di densità con soluzione Histopaque-1.077® (Sigma). Nello specifico, il volume di sangue prelevato in anticoagulante (K₃-EDTA) è stato delicatamente stratificato sopra un ugual volume di soluzione Histopaque-1.077®, quindi sottoposto a centrifugazione per 30 minuti a 400 xg.

Dopo centrifugazione, le cellule mononucleate (dette anche *buffy coat*) sono state prelevate con pipetta pasteur e sottoposte a due lavaggi in soluzione tampone fosfato salino (PBS – *phosphate buffer saline*) + 1 % di siero fetale bovino (FBS – *fetal bovine serum*) (Gibco) inattivato con calore (65°C per 30 minuti) con centrifugazione per 5 minuti a 400 xg.

I campioni cellulari sono stati quindi congelati a -80°C in provette da congelamento (cryovials) all'interno di dispositivi appositi Mr. Frosty® (Sigma; il dispositivo permette un congelamento graduale con gradiente di 1°C/minuto in modo da minimizzare gli effetti negativi del congelamento sulla vitalità cellulare) in terreno di congelamento completo (cRPMI) a base di terreno RPMI-1640 + 10% FBS inattivato e supplementato con 1% penicillina/streptomina, 1% amfotericina B (fungizone), 1% glutammina, 1% amminoacidi non essenziali (Sigma), a cui è stato aggiunto il 40% di FBS inattivato e il 10% di DMSO (dimetilsolfossido) come crioprotettivo. Dopo 24 ore, i campioni sono stati trasferiti in azoto liquido per una conservazione a medio-lungo periodo.

Al momento dell'analisi, i campioni sono stati scongelati rapidamente trasferendo le cryovials dall'azoto liquido a 37°C in bagno termostato in modo da minimizzare gli effetti negativi sulla vitalità cellulare. Le cellule sono state sottoposte a due lavaggi in cRPMI aggiunto lentamente (per eliminare il DMSO), ri-sospese nello stesso terreno, e contate al microscopio ottico in camera di

Bürker con soluzione 0,4% Trypan blue (Sigma). Utilizzando questa soluzione, vengono contate le cellule vive che escludono il colorante, mentre le cellule morte o in fase di morte si colorano di blu; nello specifico, la vitalità è risultata sempre maggiore del 95%. Effettuate 3 conte per ciascun campione nei quadranti della camera di Bürker, si è calcolata la concentrazione cellulare del campione moltiplicando la media delle 3 conte x 2 (fattore di diluizione; 30 µl di cellule + 30 µl di Trypan blue) x 10.000 (fattore di conversione della camera di Bürker per riportare la conta da 0,1 µl a 1 ml di sospensione cellulare), ottenendo quindi il numero di cellule per ml di sospensione.

Analisi dei linfociti T regolatori mediante citofluorimetria a flusso

Per l'analisi in citofluorimetria a flusso dei linfociti T regolatori è stato predisposto e ottimizzato un protocollo di marcatura dei marcatori di superficie CD4 e CD25, e del marcatore intracellulare FoxP3 (fattore di trascrizione). La tripla positività CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ permette di identificare e quantificare la percentuale di Tregs del campione. I risultati ottenuti sono riportati come percentuale di cellule CD25⁺FoxP3⁺ sul totale delle cellule CD4⁺ all'interno della popolazione di linfociti selezionati con il programma del citofluorimetro mediante operazione di *gating*.

Essendo stati quantificati in parallelo il numero di globuli bianchi totali (WBC – *White Blood Cells*) e la percentuale di linfociti ematici mediante esame emocromocitometrico e formula leucocitaria rispettivamente, si è calcolato il numero di linfociti totali (valore assoluto: n° di cellule per microlitro), quindi il valore assoluto di Tregs (n° Tregs/µl), calcolando la percentuale totale di cellule CD25⁺FoxP3⁺ sulla percentuale totale di cellule CD4⁺ quantificate con il citofluorimetro all'interno della popolazione di linfociti, quindi calcolando il valore assoluto rispetto al numero totale di linfociti ottenuto dall'esame emocromocitometrico e dalla formula leucocitaria.

Prima di procedere alla marcatura, il volume contenente 500.000 cellule in cRPMI è stato prelevato da ciascun campione e aggiunto in provette da citometria. Le cellule sono state sottoposte a un lavaggio con 1 ml di PBS + 1% FBS inattivato freddo e centrifugate a 400 xg per 5 minuti.

Campioni di cellule non marcate sono state utilizzate come controllo negativo.

Il seguente protocollo ottimizzato è stato utilizzato per la marcatura dei Tregs.

- Marcare con 5 µl di anticorpo anti-dog-CD4-AlexaFluor-647 (canale di fluorescenza FL4, laser rosso) 1/10 e 5 µl di anti-dog-CD25-FITC (FL1) 1/5 per 30 min. a 4°C al buio.
- Lavare con 2 ml di PBS + 1% FBS inattivato freddo e centrifugare a 400 xg per 5 minuti.
- Risospendere le cellule con vortex a bassa velocità, quindi aggiungere 1 ml di soluzione di fissazione Fixation/Permeabilization 1/4 in soluzione Diluent (4x, kit eBioscience) preparata al momento (non conservare per più di 1 giorno), e agitare con vortex a bassa velocità.

- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (T.A.) al buio (la metodica può essere interrotta e i campioni mantenuti fissati a 4°C per 24 ore).
- Lavare con 2 ml di soluzione di permeabilizzazione Permeabilization Buffer 1/10 in acqua distillata (10x, kit eBioscience, filtrato 0,45 µm) e centrifugare a 400 xg per 5 minuti.
- Lavare con 1 ml di Permeabilization Buffer 1/10 in acqua distillata e centrifugare a 400 xg per 5 minuti.
- Risospendere le cellule con vortex a bassa velocità e incubare con 5 µl di anticorpo anti-mouse/rat-FoxP3-PE (FL2) 1/4 per 40 minuti a T.A. al buio.
- Lavare con 2 ml di Permeabilization Buffer 1/10 in acqua distillata e centrifugare a 400 xg per 5 minuti.
- Lavare con 1 ml di Permeabilization Buffer 1/10 in acqua distillata e centrifugare a 400 xg per 5 minuti.
- Risospendere le cellule in 300 µl di PBS + 1% FBS inattivato.
- Acquisire il campione al citofluorimetro: gate (selezione) nel grafico degli scatter [Forward Scatter (FSC) vs. Side Scatter (SSC); parametri fisici di dispersione della luce) sui linfociti (basso SSC: side scatter)]. Lettura di almeno 100.000 eventi nel gate, flusso del campione: medio o alto.

L'analisi è stata effettuata con citofluorimetro a flusso a doppio laser (blu-rosso) Cytomics FC500 e programma CXP (Beckman Coulter).

Reagenti

- Anti-dog-CD4-AF647: cat. MCA1038A647, BIO-RAD, clone YKIX302.9, IgG2a
- Anti-dog-CD25-FITC: cat. MCA5916F, BIO-RAD, clone P4A10, IgG1
- Anti-mouse/rat-FoxP3-PE: cat. 12-5773-80B, eBioscience/PRODOTTI GIANNI, clone FJK-16s, IgG2ak
- FoxP3 Staining Set PE: cat. 72-5775-40, eBioscience/PRODOTTI GIANNI

Analisi statistica

Ai fini dell'elaborazione statistica si è progettato di suddividere la popolazione in esame in gruppi in base alla tipologia neoplastica: tumori epiteliali, mesenchimali e rotondocellulari. È stato utilizzato il test di Shapiro-Wilk per valutare la normalità delle variabili. Le variabili distribuite non normalmente sono state descritte con mediana e intervallo.

Le differenze per la percentuale di Tregs tra cani sani e cani tumorali sono state valutate mediante il test t di Student, i risultati sono stati considerati significativi con $p\text{-value} \leq 0,05$.

Sulle variabili continue di interesse (% Tregs circolanti e numero assoluto Tregs circolanti) si è utilizzato un modello lineare misto per informazioni ripetute, prendendo in considerazione i seguenti fattori fissi: tempo (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , e T_4), tipologia tumorale (neoplasie epiteliali, neoplasie rotondocellulari e neoplasie mesenchimali) e presenza/assenza di chirurgia. Tramite un'analisi della varianza ANOVA si è valutato quali fattori fossero significativi nel modello ($p\text{-value} \leq 0,05$). Per i fattori significativi, sono state ricavate le stime medie mediante il metodo dei minimi quadrati (LSM – *Ordinary Least Squares*). Questa tecnica viene spesso utilizzata in analisi della varianza (ANOVA) e modelli lineari generalizzati per ottenere stime medie dei livelli delle variabili risposta, controllando per altri fattori nel modello.

Il tempo di sopravvivenza globale dell'animale (OST – *Overall Survival Time*) è stato definito come il periodo compreso tra il primo giorno di trattamento di MC e la morte dell'animale per qualsiasi causa. Pazienti vivi alla chiusura dello studio sono stati censorati dall'analisi di sopravvivenza. L'OST mediano è stato stimato utilizzando lo stimatore del prodotto limite noto come stimatore di Kaplan-Meier.

Risultati

Studio preliminare

Per la fase preliminare sono stati inclusi 14 pazienti sani (Tabella 1). Questa popolazione era composta da 7 meticci, un breton, un pastore tedesco, un labrador retriever, un pastore australiano, un lagotto, un bassotto tedesco ed uno schnauzer. Di questi, 13 erano femmine (5 sterilizzate) ed 1 maschio intero. La media dell'età era di 6,1 anni e il peso medio era di 23,4 kg.

La percentuale media di Tregs circolanti, riscontrata tramite citofluorimetria, era di 2,75%.

Pazienti sani (14)	
Razza	
Meticcio	7
Pastore tedesco	1
Labrador retriever	1
Pastore australiano	1
Lagotto	1
Bassotto tedesco	1
Schnauzer	1
Breton	1
Sesso	
Femmina intera	8
Femmina sterilizzata	5
Maschio intero	1
Età media $\pm$ ds (anni)	6,1 $\pm$ 3,95
Peso medio $\pm$ ds (kg)	23,40 $\pm$ 12,90
Media Tregs $\pm$ ds (%)	2,75 $\pm$ 0,73
Mediana Tregs (%)	2,77 (1,75-4)

Tabella 1. Popolazione pazienti sani

Per quanto riguarda la popolazione di cani affetti da neoplasia ma non sottoposti a MC (Tabella 2), sono stati inclusi 22 cani, di cui 12 meticci, 2 cocker spaniel e i restanti appartenenti a una delle seguenti razze: siberian husky, golden retriever, segugio dei Balcani, pinscher, rottweiler, dobermann, saluki, pastore australiano, cavalier king charles spaniel e boxer. Di questi, 18 erano femmine (8 sterilizzate) e 4 maschi (2 castrati). La media dell'età e del peso era rispettivamente di 9,9 anni e di 23,15 kg. Il 50% dei pazienti era affetto da una neoplasia epiteliale (adenocarcinoma delle ghiandole apocrine dei sacchi anali, adenocarcinoma polmonare, adenoma delle ghiandole circumanali, adenoma mammario, carcinoma mammario, carcinoma squamoso e carcinoma tiroideo), il 32% da

una neoplasia rotondocellulare (mastocitoma) ed il 18% da una neoplasia mesenchimale (emangiosarcoma, osteosarcoma e sarcoma dei tessuti molli).

La percentuale media di Tregs circolanti era pari al 6,52%.

La differenza delle percentuali di Tregs circolanti tra pazienti sani e neoplastici è risultata statisticamente significativa con un $p\text{-value} \leq 0,001$. Come evidente dalla Figura 2, la deviazione standard, soprattutto nella popolazione neoplastica, è piuttosto ampia.

	Pazienti neoplastici (22)
Razza	
Meticcio	10
Cocker spaniel	2
Golden retriever	1
Segugio dei Balcani	1
Pinscher	1
Rottweiler	1
Dobermann	1
Saluki	1
Pastore australiano	1
Cavalier King Charles spaniel	1
Boxer	1
Siberian Husky	1
Sesso	
Femmina intera	10
Femmina sterilizzata	8
Maschio intero	2
Maschio castrato	2
Età media $\pm$ ds (anni)	$9,9 \pm 2,42$
Peso medio $\pm$ ds (kg)	$23,15 \pm 10,92$
Tipologia tumorale	
Mastocitoma	7
Carcinoma squamoso	4
Adenoma gh. circumanali	2
Osteosarcoma	2
Carcinoma mammario	1
Adenocarcinoma polmonare	1
Carcinoma tiroideo	1
Emangiosarcoma	1
Ostrosarcoma	1
Adenocarcinoma gh. apocrine dei sacchi anali	1
Sarcoma dei tessuti molli	1
Media Tregs $\pm$ ds (%)	$6,52 \pm 2,36$
Mediana Tregs (%)	$5,98 (3,27-12,05)$

Tabella 2. Popolazione pazienti neoplastici

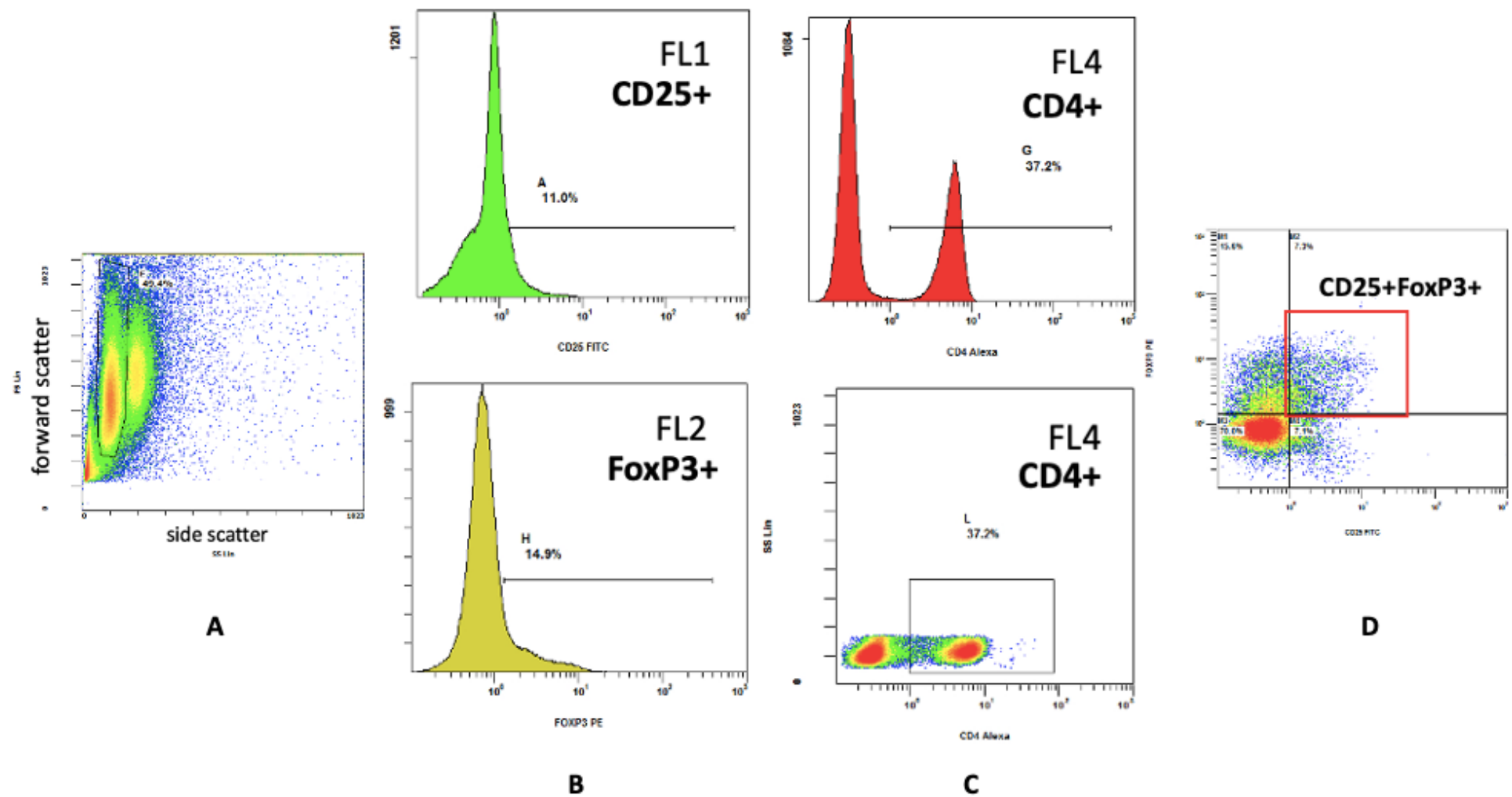


Figura 1. Esame citofluorimetrico per la determinazione della percentuale dei Tregs in un soggetto affetto da osteosarcoma appendicolare (A) Selezione della popolazione linfocitaria (gating). Acquisizione di 100.000 eventi nel gate. (B) Valutazione delle fluorescenze (canali FL1-FL2-FL4). (C) selezione delle cellule CD4⁺ (gating). (D) Quantificazione delle cellule CD25⁺FoxP3⁺ all'interno delle cellule CD4⁺

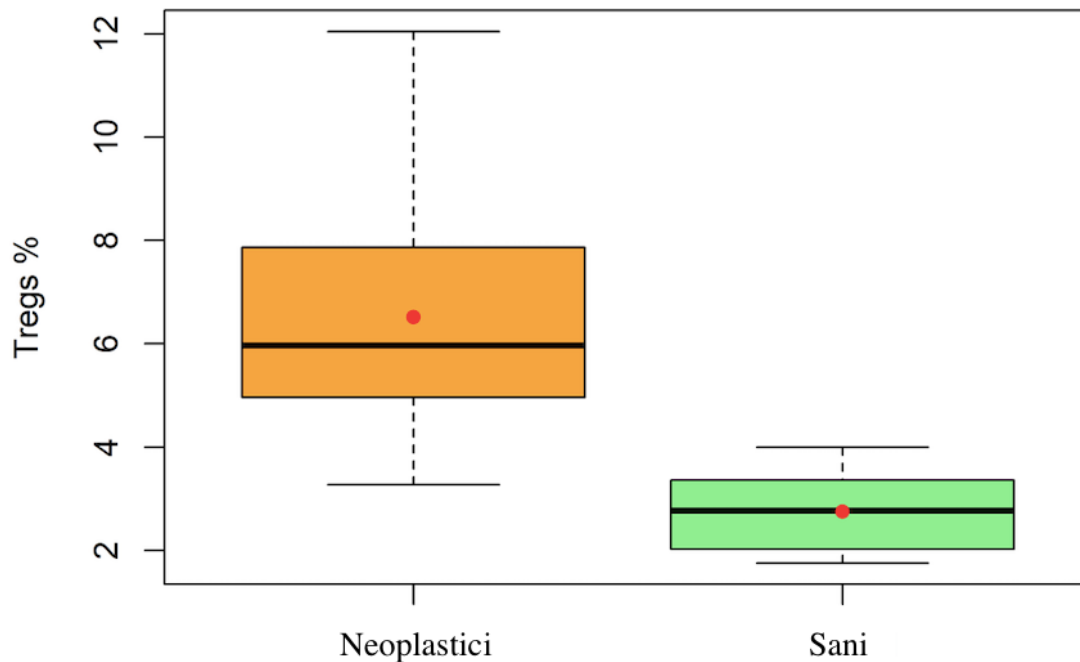


Figura 2. Percentuali di Tregs circolanti ottenuti da cani neoplastici ($n = 22$) e cani sani ($n = 14$). I trattini verticali rappresentano i singoli cani, i punti rossi rappresentano la media del gruppo, le linee orizzontali spesse rappresentano la mediana del gruppo. La differenza tra i due è statisticamente significativa ($p\text{-value} \leq 0,001$)

Chemioterapia metronomica: lo studio

Per quanto riguarda lo studio vero e proprio, sono stati inclusi 29 pazienti (Tabella 3): 10 meticci, 4 rottweiler, 2 golden retriever e 1 cane appartenente a ciascuna delle seguenti razze: border collie, pastore tedesco, golden retriever, airedale terrier, Labrador retriever, bouledogue francese, bovaro del Bernese, setter inglese, cane corso, dobermann, siberian husky, boxer e bracco tedesco. Di questi pazienti, 18 erano femmine (7 sterilizzate) e 11 erano maschi (5 castrati). La media dell'età e del peso era rispettivamente di 10,9 anni e 28,82 kg.

Il 44% dei pazienti era affetto da una neoplasia epiteliale (adenocarcinoma epatico, adenocarcinoma timico, adenocarcinoma gastrico, adenocarcinoma surrenalico, adenocarcinoma delle ghiandole circumanali, adenocarcinoma delle ghiandole salivari, adenocarcinoma mammario, carcinoma rettale, carcinoma squamoso e carcinoma uroteliale), il 28% da una neoplasia rotondocellulare (melanoma e sarcoma istiocitario) ed il 28% da una neoplasia mesenchimale (emangiosarcoma, ameloblastoma, osteosarcoma, liposarcoma mixoide e sarcoma dei tessuti molli). La diagnosi è stata ottenuta mediante esame istologico nei soggetti sottoposti a chirurgia, mediante esame istologico o citologico in quelli in stadio IV o non operati; pertanto, di questi ultimi non è sempre stato possibile riportare il grado.

In prima presentazione il 62% (18/29) dei pazienti presentava metastasi (regionali o a distanza). Sedici pazienti (55,2%) sono stati sottoposti ad intervento chirurgico dopo la presentazione presso l'OVUD per resezione del tumore primario. In 5 di questi (31,3%), la resezione chirurgica è risultata incompleta all'esame istologico (malattia microscopica) e i proprietari hanno rifiutato terapie più aggressive.

	Pazienti MC (29)
Razza	
Meticcio	10
Rottweiler	4
Golden retriever	2
Airedale terrier	1
Labrador retriever	1
Pastore tedesco	1
Bouledogue francese	1
Bovaro del Bernese	1
Setter inglese	1
Corso	1
Pastore tedesco	1
Dobermann	1
Siberian Husky	1
Boxer	1
Bracco tedesco	1
Border Collie	1
Sesso	
Femmina intera	11
Femmina sterilizzata	7
Maschio intero	6
Maschio castrato	5
Età media $\pm$ ds (anni)	10,9 $\pm$ 2,39
Peso medio $\pm$ ds (kg)	28,82 $\pm$ 11,88
Tipologia tumorale	
Melanoma orale	7
Osteosarcoma	3
Carcinoma squamoso	3
Carcinoma uroteliale	2
Emangiosarcoma	2
Adenocarcinoma gh. salivari	1
Adenocarcinoma mammario	1
Carcinoma rettale	1
Adenocarcinoma gastrico	1
Adenocarcinoma surrenalico	1
Ameloblastoma amiloide	1
Adenocarcinoma epatico	1
Sarcoma istiocitario	1
Adenocarcinoma gh. circumanali	1
Adenocarcinoma timico	1
Sarcoma dei tessuti molli	1
Liposarcoma mixoide	1
Metastasi	
Presente	18
Assente	11
Chirurgia	
Si	16
No	13

Tabella 3. Popolazione pazienti neoplastici trattati con chemioterapia metronomica

La MC è stata impiegata come terapia di prima linea in 27 pazienti (o per presenza di malattia metastatica avanzata o per rifiuto da parte del proprietario della terapia di elezione) e come terapia di consolidamento in 2 soggetti ai quali era stata precedentemente somministrata la chemioterapia MTD (mitoxantrone) per carcinoma uroteliale. La durata mediana di trattamento è stata di 132 giorni (range 22-420 giorni); soltanto il 34,5% (10/29) dei pazienti ha completato i 6 mesi di trattamento, i restanti 19 sono morti prima del termine oppure la terapia è stata interrotta per importante progressione della patologia.

La ciclofosfamide è stata utilizzata in tutti i cani e somministrata ad un dosaggio fisso, per ogni paziente, di 12,5 mg/m² per bocca una volta al giorno. L'antinfiammatorio non steroideo invece è stato impiegato in 26 pazienti; in 3 soggetti affetti da pregressa malattia renale cronica si è deciso di non somministrarlo. Per tollerabilità, maneggevolezza e praticità di somministrazione si è optato per il meloxicam a 0,1 mg/kg per bocca una volta al giorno anziché il piroxicam.

Secondo la classificazione degli effetti collaterali proposta dalla VCOG-CTAE v2 (LeBlanc et al., 2021), 2 pazienti su 29 (6,9%) hanno mostrato lieve letargia classificata come grado I. Come da linee guida e considerato il basso grado dell'effetto collaterale, non sarebbe stato necessario modificare il protocollo terapeutico; tuttavia, in accordo con i proprietari e per supportare la qualità di vita dei pazienti, è stato scalato il dosaggio giornaliero della talidomide (ritenuta responsabile dell'effetto collaterale) per ognuno del 10%, con conseguente completa risoluzione della sintomatologia. Quattro pazienti hanno mostrato un rialzo della creatinina sierica di grado I. In questi casi è stata portata la somministrazione del FANS (meloxicam) a giorni alterni, inoltre è stato consigliato d'implementare l'apporto idrico aggiungendo acqua al cibo. Dopo i provvedimenti, il parametro sierico si è stabilizzato in tutti e quattro i pazienti. Due cani hanno sviluppato la sindrome dell'occhio secco, entrambi di grado II (probabilmente dovuta alla riduzione della tolleranza immunitaria periferica), stabilizzati tramite l'utilizzo topico di colliri a base di un immunosoppressore, la ciclosporina. Infine, 4 pazienti hanno presentato tossicità midollare sotto forma di neutropenia di grado I, asintomatica; in questi casi non è mai stato necessario ridurre il dosaggio dell'agente chemioterapico (ciclofosfamide).

L'OST mediano della popolazione è stato di 160 giorni (range 25-1016 giorni) (Figura 3). Alla chiusura dello studio, 6 cani erano ancora vivi; uno affetto da adenocarcinoma delle ghiandole circumanali metastatico (395 giorni di MC), uno affetto da adenocarcinoma surrenalico (301 giorni di MC), uno affetto da melanoma orale (223 giorni di MC), uno affetto da ameloblastoma amiloide (224 giorni di MC), uno affetto da liposarcoma mixoide (192 giorni di MC) ed uno da emangiosarcoma sottocutaneo (358 giorni di MC). L'OST mediano dei pazienti vivi alla chiusura dello studio era di 698 giorni (range 486-1016 giorni).

Ventidue pazienti sono deceduti per cause legate alla neoplasia primaria ed uno (sarcoma istiocitario) in seguito allo sviluppo di un linfoma multicentrico, per il quale il proprietario ha deciso di procedere con l'eutanasia. La durata mediana di terapia e l'OST mediano di questo sottogruppo erano rispettivamente di 76 giorni (range 22-313 giorni) e di 129 giorni (range 25-511 giorni).

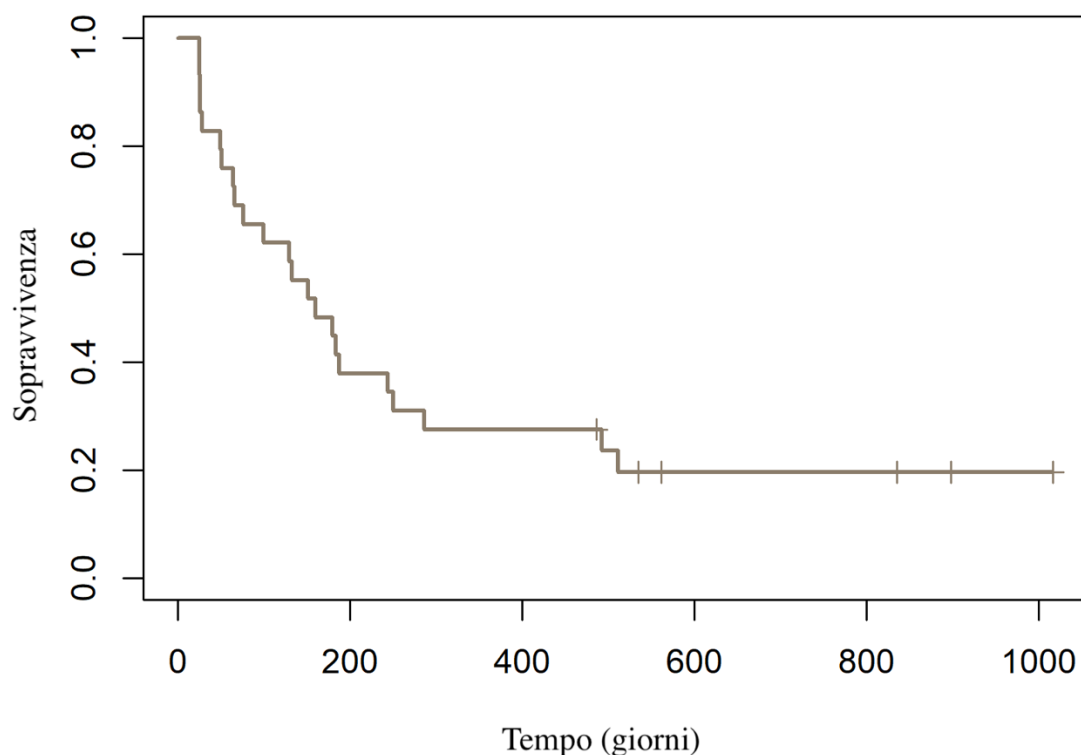


Figura 3. Curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier dei pazienti neoplastici in cura con MC

In totale sono stati esaminati 104 campioni ematici per la valutazione della percentuale e del numero assoluto di Tregs circolanti della popolazione in esame.

Nella popolazione di pazienti neoplastici in cura con la MC non sono state rilevate differenze statisticamente significative nella percentuale dei Tregs circolanti a livello dei diversi check-point (Figura 4 e Tabella 4), sebbene sia visibile un andamento bifasico, con un'iniziale riduzione seguita da un nuovo aumento, fino ad arrivare ad un valore superiore a quello rilevato a T0.

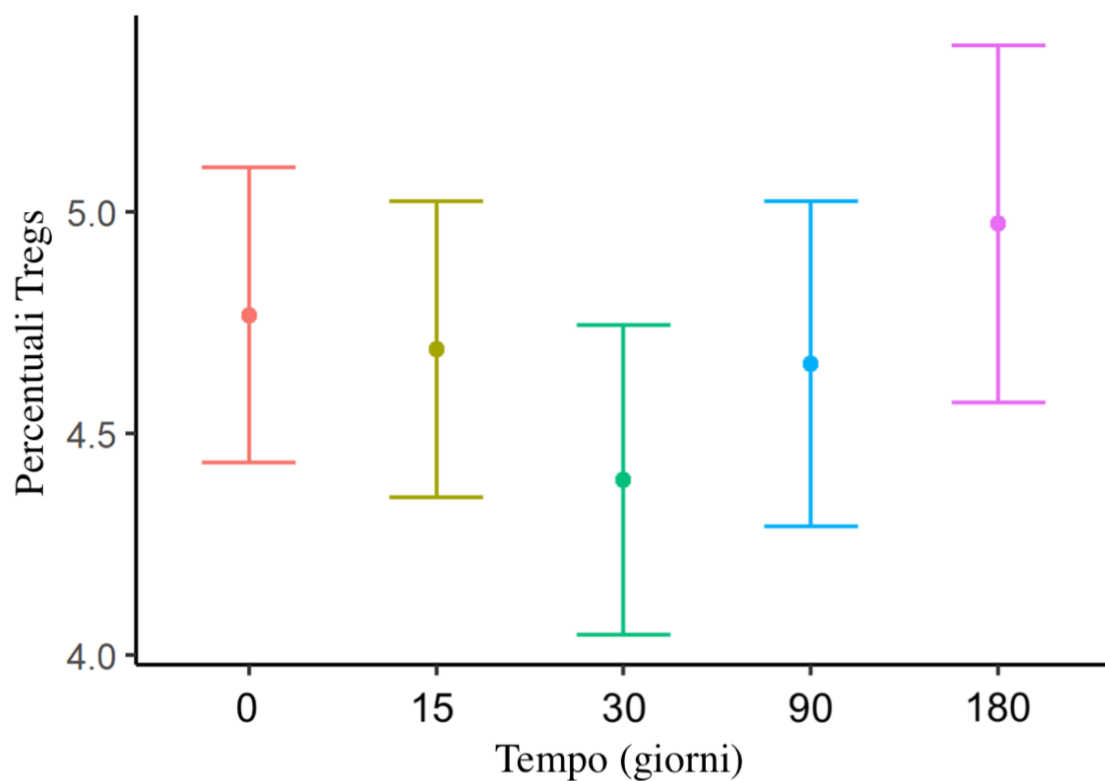


Figura 4. Percentuali medie dei Tregs circolanti con intervalli di confidenza

T (giorni)	Numero pazienti	Media Tregs (%)	Errore standard	IC inferiore	IC superiore
0	29	4,77	0,3	4,09	5,44
15	29	4,69	0,3	4,01	5,37
30	21	4,39	0,4	3,69	5,1
90	17	4,66	0,4	3,92	5,39
180	10	4,97	0,4	4,17	5,78

Tabella 4. Percentuali medie dei Tregs circolanti con intervalli di confidenza

È risultata, invece, statisticamente significativa ($p\text{-value} = 0,019$) la riduzione del numero assoluto dei Tregs circolanti con il prolungarsi del trattamento metronomico (Figura 5 e Tabella 5).

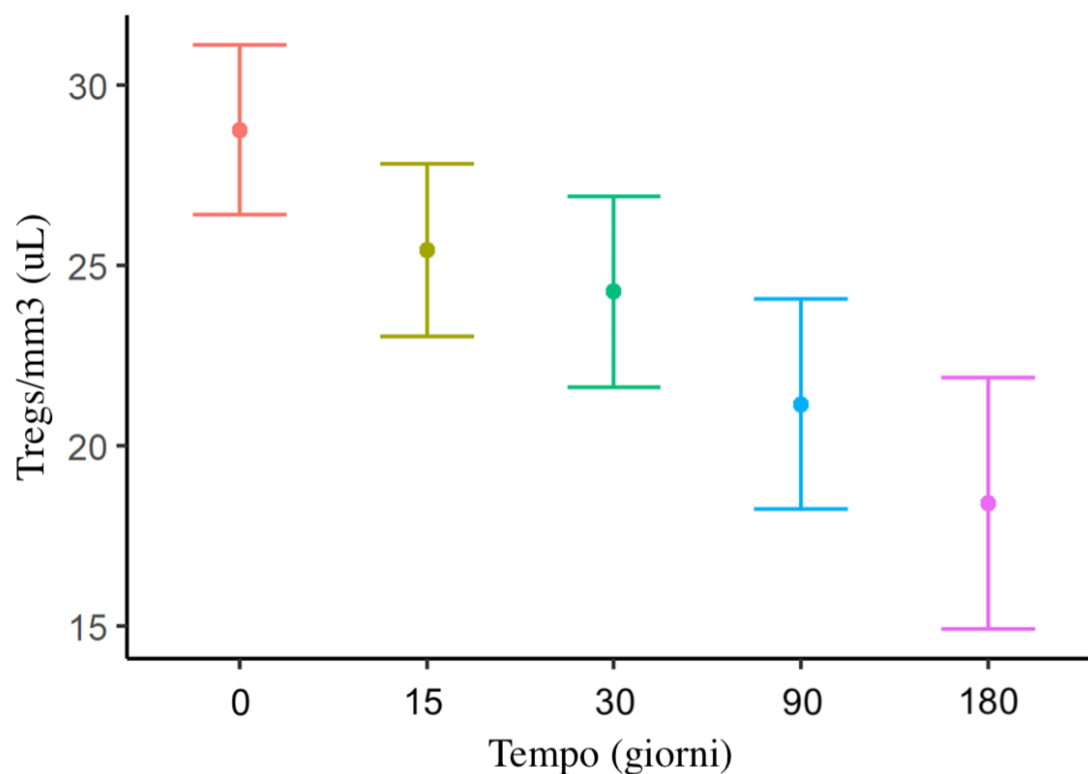


Figura 5. Valori assoluti medi dei Tregs circolanti con intervalli di confidenza

T (giorni)	Numero pazienti	Media Tregs/mm ³ (μL)	Errore standard	IC inferiore	IC superiore
0	29	28,8	2,4	24,0	33,5
15	29	25,4	2,4	21,0	30,2
30	21	24,3	2,7	19,0	29,5
90	17	21,1	2,9	15,0	27,0
180	10	18,4	3,5	12,0	25,3

Tabella 5. Valori assoluti medi dei Tregs circolanti con intervalli di confidenza

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative rispetto all'andamento del numero assoluto dei Tregs circolanti, né tra il gruppo di cani sottoposti anche a chirurgia pre-chemioterapia metronomica rispetto ai non operati (p-value = 0,54), né sulla base della tipologia tumorale (forme epiteliali, mesenchimali o rotondocellulari) (p-value = 0,18).

Discussione

La chemioterapia metronomica è conosciuta e utilizzata sia in medicina umana sia veterinaria da molti anni, ma i meccanismi alla base del suo funzionamento, almeno in ambito veterinario, sono ancora poco conosciuti. Nel 2011 Burton et al. hanno dimostrato che la somministrazione giornaliera della sola ciclofosfamide a bassi dosaggi era in grado di ridurre significativamente il numero assoluto di linfociti T regolatori circolanti in 11 cani affetti da sarcoma dei tessuti molli (Burton et al., 2011). Un anno dopo, Mitchell et al. hanno dimostrato, in 15 cani affetti da sarcoma dei tessuti molli, un risultato simile con la somministrazione del toceranib (inibitore del recettore tirosin-chinasi) come singolo agente o associato a bassi dosaggi giornalieri di ciclofosfamide (Mitchell et al., 2012). Nonostante fossero risultati incoraggianti, da allora, in medicina veterinaria, l'argomento non è stato ulteriormente indagato.

Alla luce di ciò, l'obiettivo principale del presente studio è stato di valutare, in cani affetti da neoplasia, l'effetto della chemioterapia metronomica sul sistema immunitario ed in particolare sui linfociti T regolatori circolanti utilizzando, non un protocollo *single agent*, bensì un protocollo combinato a base di ciclofosfamide, meloxicam e talidomide, protocollo oggi comunemente utilizzato nella pratica clinica. Il valore percentuale dei Tregs circolanti è stato valutato mediante esame citofluorimetrico e il numero assoluto è stato calcolato rapportando questa percentuale al numero assoluto dei linfociti totali ricavato tramite esame emocromocitometrico ottenuto dallo stesso campione di sangue. Si è quindi osservato che il numero assoluto di Tregs circolanti si riduceva in modo statisticamente significativo e costante all'aumentare della durata della MC, mentre la percentuale presentava un andamento altalenante, con un'iniziale riduzione seguita da un rialzo repentino a partire dal T3 (90 giorni).

Se l'andamento del numero assoluto dei Tregs circolanti è in accordo con la letteratura a disposizione (Burton et al., 2011; Mitchell et al., 2012) non è altrettanto vero per la percentuale dei Tregs circolanti. La discrepanza riscontrata nella nostra popolazione può essere spiegata dal fatto, ormai noto da anni nell'uomo, che il numero assoluto dei linfociti circolanti non è un valore fisso bensì variabile nel tempo; evidenze dimostrano che il valore può cambiare da un giorno all'altro (Bertouch et al., 1983; Afoke et al., 1993; Huang et al., 2015). Un ulteriore studio ha addirittura dimostrato variazioni del numero assoluto di linfociti in funzione del ritmo circadiano (Mazzocchi et al., 2010).

Ad oggi la maggior parte della letteratura che valuta la sottopopolazione dei linfociti T regolatori, sia veterinaria sia umana, riporta i risultati della valutazione citofluorimetrica solo come valore percentuale delle cellule esaminate, così come ottenuto dalla macchina (Denies et al., 2017; Huijts et

al., 2019). È probabile che questo sia dovuto all'impossibilità di eseguire l'esame emocromocitometrico su tutti i campioni per questioni legali, tecniche o economiche. La discrepanza osservata in questo studio induce a considerare l'importanza che questo dato riveste nella valutazione della progressione della malattia neoplastica, poiché l'utilizzo, e soprattutto l'interpretazione, della sola percentuale in corso di terapia, potrebbe non rispecchiare la realtà. La valutazione dell'andamento della sola percentuale di Tregs circolanti in corso di terapia potrebbe essere utile qualora la popolazione linfocitaria totale fosse una variabile fissa nel tempo, siccome questo non avviene, valutare la sola percentuale potrebbe portare a sottostimare o sovrastimare questa sottopopolazione linfocitaria.

Studi futuri, più omogenei per quanto riguarda la tipologia tumorale e lo stadio clinico dei pazienti, mirati a correlare l'andamento dei Tregs circolanti in corso di chemioterapia metronomica ad una risposta oggettiva alla medesima terapia, valutata tramite il RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) (Nguyen et al., 2015) potrebbero consentire di utilizzare nella pratica clinica il valore di Tregs come marker di progressione della malattia in corso di terapia. Nell'ottica di usare i linfociti T regolatori come indicatori dell'andamento di una patologia neoplastica in corso di chemioterapia metronomica, diventa fondamentale alla luce delle precedenti considerazioni, considerare il numero assoluto dei linfociti T regolatori.

In questa popolazione non sono state evidenziate differenze significative nei valori di Tregs ottenuti tra le diverse tipologie di tumore (epiteliali, mesenchimali, rotondocellulari) prese in considerazione. Questo risultato può dipendere dal basso numero totale di pazienti all'interno di ciascuna tipologia tumorale, che si riflette sull'elevata variabilità tumorale all'interno di ogni tipologia, che non ha consentito di stratificare ulteriormente la popolazione. Ad oggi, in letteratura, sono riportate evidenze discordanti a riguardo all'efficacia differente della MC in base all'istotipo tumorale. Un lavoro di Treggiari et al. del 2020 ha evidenziato che l'*outcome* di cani affetti da emangiosarcoma splenico in stadio I e II sottoposti, successivamente ad intervento chirurgico di splenectomia, a MC come terapia adiuvante, era sovrapponibile al gruppo di controllo trattato con la chemioterapia MTD di elezione a base di antracicline (Treggiari et al., 2020). Diversamente, Marconato et al. nel 2019 ha evidenziato che cani affetti da emangiosarcoma splenico in stadio III, precedentemente sottoposti a splenectomia presentavano una sopravvivenza mediana maggiore se trattati con chemioterapia MTD, seppur con effetti collaterali maggiori rispetto al gruppo trattato con MC (Marconato et al., 2019). Nel 2018 Polton et al. hanno dimostrato che pazienti affetti da carcinoma polmonare primario in stadio avanzato (T3 o N1 o M1) e sottoposti alla sola MC presentavano un tempo di sopravvivenza mediano significativamente più lungo rispetto ai cani sottoposti a chirurgia o chemioterapia MTD (Polton et al., 2018).

Sarebbe stato un obiettivo secondario di questo lavoro determinare se la MC avesse una maggiore o minore indicazione sulla base dell'istotipo tumorale; la notevole eterogeneità del campione non ha consentito di raggiungere tale obiettivo, ma è auspicabile che ampliando la casistica sarà possibile raggiungere tale obiettivo.

Per la messa appunto della tecnica citofluorimetrica sono state valutate le percentuali di Tregs circolanti in pazienti affetti da neoplasia e sono state confrontate con le percentuali di pazienti sani. Da quest'analisi è emerso che i pazienti neoplastici presentavano in media una percentuale di Tregs significativamente più elevata rispetto a quelli sani; anche questo valore è in linea con la letteratura (Burton et al., 2011; Denies et al., 2017) e atteso, in quanto tale sottopopolazione cellulare è coinvolta nell'evasione dall'immunosorveglianza dell'ospite, pertanto tende ad aumentare in corso di neoplasia (Biller, 2014). È interessante invece notare l'elevata deviazione standard nella popolazione affetta da diverse tipologie tumorali. Questo dato viene riportato analogamente anche nei lavori precedentemente citati e potrebbe essere dovuto alla diversa capacità di ciascun istotipo tumorale di mettere in atto strategie di evasione dal sistema immunitario. Secondo Tominaga et al., ad esempio, la proliferazione locale dei Tregs in corso di melanoma orale nel cane determina un aumento maggiore a livello locale, piuttosto che periferico, della percentuale dei linfociti T regolatori (Tominaga et al., 2010). Le cellule tumorali esprimono un'ampia varietà di antigeni; tra essi, alcuni sono specificamente associati (TAA – *Tumor-Associated Antigens*) o propri del tumore stesso (TSA – *Tumor-Specific Antigens*). Inoltre, questi possono essere presenti in quantità differenti a seconda dell'istotipo neoplastico e dunque indurre risposte immunitarie diverse (Vinay et al., 2015). Questa diversità suggerisce l'ipotesi che in funzione della tipologia di neoplasia, del suo comportamento biologico e della sua disseminazione nell'organismo, l'interazione con il sistema immunitario potrebbe a sua volta essere piuttosto variabile. Non solo, questo potrebbe avere un impatto anche sulla distribuzione dei linfociti T regolatori. L'esiguità del numero di campioni per ciascun istotipo in questo studio non ha permesso di stratificare la popolazione differenziandola anche sulla base del numero assoluto dei Tregs circolanti per ciascun istotipo, ma potrà essere oggetto di indagini future, dal momento che potrebbe fornire utili informazioni cliniche.

Come riportato in letteratura (Lana et al., 2007; Loven et al., 2013), la chemioterapia metronomica rappresenta una terapia medica ben tollerata. I dati a nostra disposizione confermano la letteratura citata: nessun effetto avverso ha superato il grado II secondo il VCOG-CTAE v2 (LeBlanc et al., 2021); inoltre è bastata la rimodulazione della terapia per tamponare o azzerare gli effetti riscontrati. Uno degli effetti avversi più frequenti riportato in letteratura in seguito all'uso della ciclofosfamide è la cistite emorragica, dovuta alla deposizione sulla mucosa vescicale di un metabolita di scarto irritante: l'acroleina (Elmslie et al., 2008; London et al., 2015; Gaspar et al., 2018). In regime di

terapia metronomica l'incidenza riportata di questo effetto collaterale è compresa tra 6,9 e 32% (Lana et al., 2007; Elmslie et al., 2008; Chan et al., 2016). Nella nostra popolazione, tuttavia, nessun paziente ha mostrato segni clinici di cistite né di ematuria macroscopica e questo si discosta dai dati riportati in letteratura. Potrebbe essere invece presente e sottostimata un'eventuale ematuria microscopica, poiché non è stato possibile effettuare in maniera sistematica l'esame urine di tutti i nostri pazienti, in modo da poter evidenziare anche eventuali tracce sub-cliniche del problema.

Due dei pazienti hanno sviluppato la sindrome dell'occhio secco dopo almeno 4 mesi di terapia; ad oggi, non abbiamo riscontro di eventuali segnalazioni in letteratura veterinaria. Essendo nella maggior parte dei casi una patologia su base autoimmune, si sospetta che la riduzione dei Tregs circolanti, che in condizioni fisiologiche contribuiscono a prevenire disordini autoimmuni, possa essere stato un possibile fattore scatenante (Shevach et al., 2006).

La ciclofosfamide è stato l'unico agente chemioterapico utilizzato in questo studio ad un dosaggio fisso di 12,5 mg/m² e preparato come galenico per tutti i pazienti. Lo studio di Burton et al. del 2011 ha valutato la percentuale e il numero assoluto di Tregs circolanti in 6 cani affetti da sarcoma dei tessuti molli di grado I e II trattati con somministrazioni giornaliere di ciclofosfamide a 15 mg/m² e ha osservato una riduzione significativa del numero assoluto di Tregs circolanti sia dopo 14 giorni sia dopo 28 giorni di terapia. Nello stesso studio è stato somministrato un dosaggio giornaliero di 12,5 mg/m² di ciclofosfamide ad altri 5 cani affetti da sarcoma dei tessuti molli; in questo caso la prima riduzione significativa del numero assoluto di Tregs circolanti avveniva dopo 28 giorni. In questo studio la ciclofosfamide era l'unico farmaco somministrato (Burton et al., 2011). I risultati del nostro studio tendono a confermare quanto evidenziato da Burton et al. e suggeriscono l'utilizzo del minimo dosaggio utile al fine di limitare gli effetti collaterali.

Il meloxicam in soluzione orale è stato utilizzato come prima scelta in questo studio in quanto permetteva una gestione più semplice per il proprietario rispetto a formulazioni in capsule o compresse, talvolta difficili da somministrare in soggetti poco collaborativi. Inoltre, questo permetteva, in caso di riduzione di peso in corso di terapia, di adeguare agevolmente la dose somministrata. Infine, si tratta di un principio attivo registrato anche per il cane, a differenza del piroxicam. Pur non avendo associato la somministrazione di un gastroprotettore, nessun paziente ha manifestato sintomatologia gastroenterica. L'antinfiammatorio non steroideo non è stato prescritto in tre pazienti con pregressa diagnosi di malattia renale cronica al fine di preservare la funzionalità renale.

La talidomide è stata somministrata in tutti i pazienti ed è stata generalmente ben tollerata: solamente 2 cani hanno presentato una lieve letargia classificata come grado I. Chiaramente questa terapia viene

somministrata per lo più ad una popolazione di soggetti con età avanzata, che spesso può presentare delle comorbidità già al momento della diagnosi di neoplasia. Siccome ad oggi si iniziano ad avere a disposizione dati consensuali sul dosaggio di talidomide da utilizzare, potrebbe essere interessante, alla luce dei possibili effetti collaterali del farmaco (barcollamenti, tremori, deambulazione rigida e sonnolenza) (De Campos et al., 2018; Pierini et al., 2020), prendere in considerazione eventuali comorbidità per la definizione del dosaggio ottimale.

Nella nostra popolazione la chirurgia non sembra aver inciso sulla popolazione dei linfociti T regolatori circolanti. Questo risultato non era atteso, in quanto ci si aspettava una loro diminuzione contestuale alla diminuzione del carico tumorale, come riportato in diversi studi umani che valutavano i livelli di Tregs circolanti nei pazienti il giorno dopo l'intervento chirurgico (Saito et al., 2013; Chen et al., 2014; Zhang et al., 2015; Wang et al., 2017; Market et al., 2018). Uno di questi lavori, però, ha riscontrato che l'intervento chirurgico induceva l'*up*-regolazione dei Tregs circolanti il giorno 6 dopo l'intervento e che il livello dei Tregs era correlato all'invasività dell'intervento (Saito et al., 2013). Questo aumento potrebbe promuovere eventuali recidive e metastatizzazione del tumore attraverso meccanismi differenti (Cheng et al., 2022). Pertanto, anche questo aspetto andrebbe approfondito su una popolazione di cani più ampia per meglio determinare il ruolo dell'escissione chirurgica su questa popolazione linfocitaria. Se il dato riportato da Cheng et al. fosse confermato, infatti, potrebbe aprire la discussione sull'opportunità di effettuare interventi chirurgici palliativi in soggetti con malattia in stadio avanzato, dal momento che potrebbe non migliorare le aspettative di vita o promuovere la progressione, contrariamente all'obiettivo prefisso con la riduzione del carico tumorale o l'escissione chirurgica di tumori ulcerati.

Per quanto riguarda i limiti del presente studio, innanzitutto la ridotta numerosità e disomogeneità del campione rende difficile trarre conclusioni definitive o evidenziare differenze tra i gruppi di pazienti con diversi tipologie tumorali e stadio clinico.

Non è stato possibile, inoltre, valutare l'andamento dei linfociti T regolatori circolanti in un gruppo di controllo di pazienti tumorali terminali che non assumevano terapia, principalmente per motivi economici ed etici, poiché la maggior parte dei proprietari non è disposta a sottoporre il proprio animale ad ulteriori prelievi ematologici o visite cliniche una volta presa la decisione di non trattarlo. In futuro, potrebbe essere interessante il confronto con una popolazione di pazienti in vuoto terapeutico, e con una popolazione in cura con chemioterapia MTD.

Per avere informazioni migliori sulla progressione della malattia, in modo da correlarla al meglio con l'andamento dei Tregs circolanti, sarebbe stato necessario stadiare con indagini strumentali i soggetti a intervalli corrispondenti alla valutazione citofluorimetrica. Questo non è stato possibile, soprattutto

per motivi economici, per cui ci si è basati su dati clinici, ottenuti nel corso delle visite mensili. Infine, siccome i farmaci venivano somministrati esclusivamente dai proprietari, non si ha la certezza che quest'ultima sia stata sempre eseguita nel modo più adeguato e continuativo possibile.

La qualità della vita dei cani trattati non è stata valutata con questionari standardizzati, per questo motivo la tollerabilità del trattamento poteva essere valutata solo in maniera soggettiva dai proprietari, sebbene nessuno di loro abbia riportato effetti collaterali gravi o invalidanti per il proprio animale.

Conclusioni

I linfociti T regolatori svolgono un ruolo importante nell'instaurarsi della tolleranza immunitaria e nella progressione tumorale. Pertanto, il controllo di questa popolazione di linfociti dovrebbe rappresentare uno degli obiettivi fondamentali dei trattamenti oncologici. Con il diffondersi dei protocolli di immunoterapia questo aspetto assume un'importanza ancora più rilevante. La chemioterapia metronomica potrebbe essere utilizzata in modo più mirato se fosse possibile avere maggiori indicazioni sugli istotipi neoplastici in cui dimostra maggiore efficacia. Per questo motivo potrebbe risultare di grande utilità, nella pratica clinica quotidiana, analizzare l'andamento dei linfociti T regolatori circolanti in corso di MC per individuare precocemente la progressione del tumore e modificare tempestivamente la terapia. A questo fine la citofluorimetria insieme all'emocromo rappresentano strumenti accessibili per le indagini di routine anche in ambito veterinario.

Ad oggi, a nostra conoscenza, il presente lavoro è il primo ad avere valutato l'andamento del numero assoluto dei linfociti T regolatori circolanti in cani affetti da neoplasie spontanee e sottoposti a chemioterapia metronomica a base di ciclofosfamida associata al meloxicam e alla talidomide. I dati ottenuti, seppur preliminari, forniscono risultati più precisi rispetto alla sola valutazione della percentuale e offrono diversi spunti per l'approfondimento, soprattutto nell'ottica dell'applicazione clinica dei risultati. È quindi auspicabile il proseguimento della ricerca, orientandosi verso una singola tipologia neoplastica.

Bibliografia

Afoke AO, Eeg-Olofsson O, Hed J, et al. Seasonal Variation and Sex Differences of Circulating Macrophages, Immunoglobulins and Lymphocytes in Healthy School Children. *Scand J Immunol* 1993;37(2):209–215; doi: 10.1111/j.1365-3083.1993.tb01758.x.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964–967; doi: 10.1126/science.275.5302.964.

Bahl A and Bakhshi S. Metronomic Chemotherapy in Progressive Pediatric Malignancies: Old Drugs in New Package. *Indian J Pediatr* 2012;79(12):1617–1622; doi: 10.1007/s12098-012-0759-z.

Bellmunt J, Trigo JM, Calvo E, et al. Activity of a Multitargeted Chemo-Switch Regimen (Sorafenib, Gemcitabine, and Metronomic Capecitabine) in Metastatic Renal-Cell Carcinoma: A Phase 2 Study (SOGUG-02-06). *Lancet Oncol* 2010;11(4):350–357; doi: 10.1016/S1470-2045(09)70383-3.

Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, et al. Angiogenesis in Spontaneous Tumors and Implications for Comparative Tumor Biology. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:919570; doi: 10.1155/2014/919570.

Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, et al. The Multifaceted Circulating Endothelial Cell in Cancer: Towards Marker and Target Identification. *Nat Rev Cancer* 2006;6(11):835–845; doi: 10.1038/nrc1971.

Bertouch JV, Roberts-Thomson PJ and Bradley J. Diurnal Variation of Lymphocyte Subsets Identified by Monoclonal Antibodies. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;286(6372):1171–1172.

Biller B. Metronomic Chemotherapy in Veterinary Patients with Cancer. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2014;44(5):817–829; doi: 10.1016/j.cvsm.2014.05.003.

Blansfield JA, Caragacianu D, Alexander HR, et al. Combining Agents That Target the Tumor Microenvironment Improves the Efficacy of Anticancer Therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(1):270–280; doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1562.

Bocci G, Francia G, Man S, et al. Thrombospondin 1, a Mediator of the Antiangiogenic Effects of Low-Dose Metronomic Chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(22):12917–12922; doi: 10.1073/pnas.2135406100.

Bocci G, Nicolaou KC and Kerbel RS. Protracted Low-Dose Effects on Human Endothelial Cell

Proliferation and Survival in Vitro Reveal a Selective Antiangiogenic Window for Various Chemotherapeutic Drugs¹. *Cancer Research* 2002;62(23):6938–6943.

Bracha S, Walshaw R, Danton T, et al. Evaluation of Toxicities from Combined Metronomic and Maximal-tolerated Dose Chemotherapy in Dogs with Osteosarcoma. *J of Small Animal Practice* 2014;55(7):369–374; doi: 10.1111/jsap.12228.

Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, et al. Antiangiogenic Scheduling of Chemotherapy Improves Efficacy against Experimental Drug-Resistant Cancer. *Cancer Res* 2000;60(7):1878–1886.

Burton JH, Mitchell L, Thamm DH, et al. Low-Dose Cyclophosphamide Selectively Decreases Regulatory T Cells and Inhibits Angiogenesis in Dogs with Soft Tissue Sarcoma. *Veterinary Internal Medicine* 2011;25(4):920–926; doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0753.x.

Calabrese L and Fleischer AB. Thalidomide: Current and Potential Clinical Applications. *Am J Med* 2000;108(6):487–495; doi: 10.1016/s0002-9343(99)00408-8.

Cancedda S, Marconato L, Meier V, et al. Hypofractionated Radiotherapy for Macroscopic Canine Soft Tissue Sarcoma: A Retrospective Study of 50 Cases Treated with a 5 × 6 Gy Protocol with or Without Metronomic Chemotherapy. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2016;57(1):75–83; doi: 10.1111/vru.12308.

Cazzaniga ME, Cordani N, Capici S, et al. Metronomic Chemotherapy. *Cancers* 2021;13(9):2236; doi: 10.3390/cancers13092236.

Chan CM, Frimberger AE and Moore AS. Incidence of Sterile Hemorrhagic Cystitis in Tumor-Bearing Dogs Concurrently Treated with Oral Metronomic Cyclophosphamide Chemotherapy and Furosemide: 55 Cases (2009–2015). *Javma* 2016;249(12):1408–1414; doi: 10.2460/javma.249.12.1408.

Chen C, Chen D, Zhang Y, et al. Changes of CD4+CD25+FOXP3+ and CD8+CD28- Regulatory T Cells in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Undergoing Surgery. *Int Immunopharmacol* 2014;18(2):255–261; doi: 10.1016/j.intimp.2013.12.004.

Chen X, Du Y, Lin X, et al. CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Tumor Immunity. *Int Immunopharmacol* 2016;34:244–249; doi: 10.1016/j.intimp.2016.03.009.

Cheng X, Zhang H, Hamad A, et al. Surgery-Mediated Tumor-Promoting Effects on the Immune Microenvironment. *Semin Cancer Biol* 2022;86(Pt 3):408–419; doi:

10.1016/j.semcancer.2022.01.006.

Chon E, McCartan L, Kubicek LN, et al. Safety Evaluation of Combination Toceranib Phosphate (Palladia®) and Piroxicam in Tumour-Bearing Dogs (Excluding Mast Cell Tumours): A Phase I Dose-Finding Study. *Vet Comp Oncol* 2012;10(3):184–193; doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00265.x.

Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, et al. Regulatory T Cells and Intestinal Homeostasis. *Immunol Rev* 2005;204:184–194; doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00250.x.

Damber J-E, Vallbo C, Albertsson P, et al. The Anti-Tumour Effect of Low-Dose Continuous Chemotherapy May Partly Be Mediated by Thrombospondin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58(3):354–360; doi: 10.1007/s00280-005-0163-8.

De Campos CB, Lavallo GE, Monteiro LN, et al. Adjuvant Thalidomide and Metronomic Chemotherapy for the Treatment of Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms. *In Vivo* 2018;32(6):1659–1666; doi: 10.21873/invivo.11429.

Dellapasqua S, Mazza M, Rosa D, et al. Pegylated Liposomal Doxorubicin in Combination with Low-Dose Metronomic Cyclophosphamide as Preoperative Treatment for Patients with Locally Advanced Breast Cancer. *Breast* 2011;20(4):319–323; doi: 10.1016/j.breast.2011.02.014.

Denies S, Cicchelerio L, De Rooster H, et al. Immunological and Angiogenic Markers during Metronomic Temozolomide and Cyclophosphamide in Canine Cancer Patients. *Vet Comparative Oncology* 2017;15(2):594–605; doi: 10.1111/vco.12203.

Ekena J, Wood E, Manchester A, et al. Glutathione-S-transferase-theta Genotypes and the Risk of Cyclophosphamide Toxicity in Dogs. *Vet Comparative Oncology* 2018;16(4):529–534; doi: 10.1111/vco.12411.

Elmslie R e., Glawe P and Dow S w. Metronomic Therapy with Cyclophosphamide and Piroxicam Effectively Delays Tumor Recurrence in Dogs with Incompletely Resected Soft Tissue Sarcomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008;22(6):1373–1379; doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0179.x.

Emmenegger U, Man S, Shaked Y, et al. A Comparative Analysis of Low-Dose Metronomic Cyclophosphamide Reveals Absent or Low-Grade Toxicity on Tissues Highly Sensitive to the Toxic Effects of Maximum Tolerated Dose Regimens. *Cancer Res* 2004;64(11):3994–4000; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0580.

Fidler IJ and Ellis LM. Chemotherapeutic Drugs—More Really Is Not Better. *Nat Med* 2000;6(5):500–502; doi: 10.1038/74969.

Finn OJ. Immuno-Oncology: Understanding the Function and Dysfunction of the Immune System in Cancer. *Ann Oncol* 2012;23 Suppl 8(Suppl 8):viii6-9; doi: 10.1093/annonc/mds256.

Finotello R, Henriques J, Sabbatini S, et al. A Retrospective Analysis of Chemotherapy Switch Suggests Improved Outcome in Surgically Removed, Biologically Aggressive Canine Haemangiosarcoma. *Vet Comp Oncol* 2017;15(2):493–503; doi: 10.1111/vco.12193.

Gaspar TB, Henriques J, Marconato L, et al. The Use of Low-dose Metronomic Chemotherapy in Dogs-Insight into a Modern Cancer Field. *Vet Comparative Oncology* 2018;16(1):2–11; doi: 10.1111/vco.12309.

Gershon RK, Cohen P, Hencin R, et al. Suppressor T Cells. *J Immunol* 1972;108(3):586–590.

Govindarajan R, Heaton KM, Broadwater R, et al. Effect of Thalidomide on Gastrointestinal Toxic Effects of Irinotecan. *Lancet* 2000;356(9229):566–567; doi: 10.1016/s0140-6736(00)02586-1.

Ha T-Y. The Role of Regulatory T Cells in Cancer. *Immune Netw* 2009;9(6):209–235; doi: 10.4110/in.2009.9.6.209.

Hamano Y, Sugimoto H, Soubasakos MA, et al. Thrombospondin-1 Associated with Tumor Microenvironment Contributes to Low-Dose Cyclophosphamide-Mediated Endothelial Cell Apoptosis and Tumor Growth Suppression. *Cancer Res* 2004;64(5):1570–1574; doi: 10.1158/0008-5472.can-03-3126.

Hanahan D, Bergers G and Bergsland E. Less Is More, Regularly: Metronomic Dosing of Cytotoxic Drugs Can Target Tumor Angiogenesis in Mice. *J Clin Invest* 2000;105(8):1045–1047; doi: 10.1172/JCI9872.

Hanahan D and Folkman J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3):353–364; doi: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.

Hanahan D and Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100(1):57–70; doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

Hermans IF, Chong TW, Palmowski MJ, et al. Synergistic Effect of Metronomic Dosing of Cyclophosphamide Combined with Specific Antitumor Immunotherapy in a Murine Melanoma Model. *Cancer Res* 2003;63(23):8408–8413.

Huang C, Li W, Wu W, et al. Intra-Day and Inter-Day Biological Variations of Peripheral Blood

Lymphocytes. Clin Chim Acta 2015;438:166–170; doi: 10.1016/j.cca.2014.08.009.

Huijts CM, Loughheed SM, Bodalal Z, et al. The Effect of Everolimus and Low-Dose Cyclophosphamide on Immune Cell Subsets in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results from a Phase I Clinical Trial. Cancer Immunol Immunother 2019;68(3):503–515; doi: 10.1007/s00262-018-2288-8.

Josefowicz SZ, Lu L-F and Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. Annu Rev Immunol 2012;30:531–564; doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.

Kerbel RS. Improving Conventional or Low Dose Metronomic Chemotherapy with Targeted Antiangiogenic Drugs. Cancer Res Treat 2007;39(4):150–159; doi: 10.4143/crt.2007.39.4.150.

Kerbel RS and Kamen BA. The Anti-Angiogenic Basis of Metronomic Chemotherapy. Nat Rev Cancer 2004;4(6):423–436; doi: 10.1038/nrc1369.

Kerbel RS and Shaked Y. The Potential Clinical Promise of “multimodality” Metronomic Chemotherapy Revealed by Preclinical Studies of Metastatic Disease. Cancer Lett 2017;400:293–304; doi: 10.1016/j.canlet.2017.02.005.

Klement G, Baruchel S, Rak J, et al. Continuous Low-Dose Therapy with Vinblastine and VEGF Receptor-2 Antibody Induces Sustained Tumor Regression without Overt Toxicity. J Clin Invest 2000;105(8):R15–R24.

Knapp DW, Richardson RC, Chan TC, et al. Piroxicam Therapy in 34 Dogs with Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. J Vet Intern Med 1994;8(4):273–278; doi: 10.1111/j.1939-1676.1994.tb03232.x.

Koumarianou A, Christodoulou M-I, Patapis P, et al. The Effect of Metronomic versus Standard Chemotherapy on the Regulatory to Effector T-Cell Equilibrium in Cancer Patients. Experimental Hematology & Oncology 2014;3(1):3; doi: 10.1186/2162-3619-3-3.

Kretschmer K, Apostolou I, Jaeckel E, et al. Making Regulatory T Cells with Defined Antigen Specificity: Role in Autoimmunity and Cancer. Immunol Rev 2006;212:163–169; doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00411.x.

Lana S, U'ren L, Plaza S, et al. Continuous Low-Dose Oral Chemotherapy for Adjuvant Therapy of Splenic Hemangiosarcoma in Dogs. J Vet Intern Med 2007;21(4):764–769; doi: 10.1892/0891-6640(2007)21[764:clocfa]2.0.co;2.

- Leach TN, Childress MO, Greene SN, et al. Prospective Trial of Metronomic Chlorambucil Chemotherapy in Dogs with Naturally Occurring Cancer. *Vet Comp Oncol* 2012;10(2):102–112; doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00280.x.
- LeBlanc AK, Atherton M, Bentley RT, et al. Veterinary Cooperative Oncology Group—Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE v2) Following Investigational Therapy in Dogs and Cats. *Vet Comparative Oncology* 2021;19(2):311–352; doi: 10.1111/vco.12677.
- Liu J-Y, Wu Y, Zhang X-S, et al. Single Administration of Low Dose Cyclophosphamide Augments the Antitumor Effect of Dendritic Cell Vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56(10):1597–1604; doi: 10.1007/s00262-007-0305-4.
- London CA, Gardner HL, Mathie T, et al. Impact of Toceranib/Piroxicam/Cyclophosphamide Maintenance Therapy on Outcome of Dogs with Appendicular Osteosarcoma Following Amputation and Carboplatin Chemotherapy: A Multi-Institutional Study. Bouvard D. ed. *PLoS ONE* 2015;10(4):e0124889; doi: 10.1371/journal.pone.0124889.
- Loven D, Hasnis E, Bertolini F, et al. Low-Dose Metronomic Chemotherapy: From Past Experience to New Paradigms in the Treatment of Cancer. *Drug Discov Today* 2013;18(3–4):193–201; doi: 10.1016/j.drudis.2012.07.015.
- Madondo MT, Quinn M and Plebanski M. Low Dose Cyclophosphamide: Mechanisms of T Cell Modulation. *Cancer Treat Rev* 2016;42:3–9; doi: 10.1016/j.ctrv.2015.11.005.
- Malik PS, Raina V and André N. Metronomics as Maintenance Treatment in Oncology: Time for Chemo-Switch. *Front Oncol* 2014;4:76; doi: 10.3389/fonc.2014.00076.
- Marchetti V, Giorgi M, Fioravanti A, et al. First-Line Metronomic Chemotherapy in a Metastatic Model of Spontaneous Canine Tumours: A Pilot Study. *Invest New Drugs* 2012;30(4):1725–1730; doi: 10.1007/s10637-011-9672-y.
- Marconato L, Chalfon C, Finotello R, et al. Adjuvant Anthracycline-Based vs Metronomic Chemotherapy vs No Medical Treatment for Dogs with Metastatic Splenic Hemangiosarcoma: A Multi-Institutional Retrospective Study of the Italian Society of Veterinary Oncology. *Vet Comp Oncol* 2019;17(4):537–544; doi: 10.1111/vco.12519.
- Market M, Baxter KE, Angka L, et al. The Potential for Cancer Immunotherapy in Targeting Surgery-Induced Natural Killer Cell Dysfunction. *Cancers (Basel)* 2018;11(1):2; doi: 10.3390/cancers11010002.

Marx GM, Pavlakis N, McCowatt S, et al. Phase II Study of Thalidomide in the Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J Neurooncol* 2001;54(1):31–38; doi: 10.1023/a:1012554328801.

Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Cancer Research* 2000;60(5):1306–1311.

Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, et al. Down Regulation of T-Cell-Derived IL-10 Production by Low-Dose Cyclophosphamide Treatment in Tumor-Bearing Rats Restores in Vitro Normal Lymphoproliferative Response. *Int Immunopharmacol* 2001;1(2):307–319; doi: 10.1016/s1567-5769(00)00028-x.

Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, et al. Th2/Th1 Switch Induced by a Single Low Dose of Cyclophosphamide in a Rat Metastatic Lymphoma Model. *Cancer Immunol Immunother* 2002;50(11):588–596; doi: 10.1007/s00262-001-0237-3.

Mazzocchi G, De Cata A, Greco A, et al. Circadian Rhythmicity of Lymphocyte Subpopulations and Relationship with Neuro-Endocrine System. *J Biol Regul Homeost Agents* 2010;24(3):341–350.

Ménard C, Martin F, Apetoh L, et al. Cancer Chemotherapy: Not Only a Direct Cytotoxic Effect, but Also an Adjuvant for Antitumor Immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57(11):1579–1587; doi: 10.1007/s00262-008-0505-6.

Milevoj N, Nemec A and Tozon N. Metronomic Chemotherapy for Palliative Treatment of Malignant Oral Tumors in Dogs. *Front Vet Sci* 2022;9:856399; doi: 10.3389/fvets.2022.856399.

Mitchell L, Thamm DH and Biller BJ. Clinical and Immunomodulatory Effects of Toceranib Combined with Low-Dose Cyclophosphamide in Dogs with Cancer. *Veterinary Internal Medicine* 2012;26(2):355–362; doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.00883.x.

Mross K and Steinbild S. Metronomic Anti-Cancer Therapy - An Ongoing Treatment Option for Advanced Cancer Patients. *Journal of Cancer Therapeutics and Research* 2012;1:32; doi: 10.7243/2049-7962-1-32.

Mutsaers AJ. Metronomic Chemotherapy. *Top Companion Anim Med* 2009;24(3):137–143; doi: 10.1053/j.team.2009.03.004.

Natale G and Bocci G. Does Metronomic Chemotherapy Induce Tumor Angiogenic Dormancy? A Review of Available Preclinical and Clinical Data. *Cancer Lett* 2018;432:28–37; doi:

10.1016/j.canlet.2018.06.002.

Nguyen SM, Thamm DH, Vail DM, et al. Response Evaluation Criteria for Solid Tumours in Dogs (v1.0): A Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) Consensus Document. *Vet Comp Oncol* 2015;13(3):176–183; doi: 10.1111/vco.12032.

Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, et al. T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development. *Immunity* 2012;37(5):785–799; doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.010.

Páez D, Labonte MJ, Bohanes P, et al. Cancer Dormancy: A Model of Early Dissemination and Late Cancer Recurrence. *Clin Cancer Res* 2012;18(3):645–653; doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2186.

Paoloni MC and Khanna C. Comparative Oncology Today. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007;37(6):1023–v; doi: 10.1016/j.cvsm.2007.08.003.

Pasquier E, Kavallaris M and André N. Metronomic Chemotherapy: New Rationale for New Directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7(8):455–465; doi: 10.1038/nrclinonc.2010.82.

Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, et al. Thalidomide in the Treatment of Patients with Hepatocellular Carcinoma: A Phase II Trial. *Cancer* 2005;103(4):749–755; doi: 10.1002/cncr.20821.

Penel N, Adenis A and Bocci G. Cyclophosphamide-Based Metronomic Chemotherapy: After 10 Years of Experience, Where Do We Stand and Where Are We Going? *Crit Rev Oncol Hematol* 2012;82(1):40–50; doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.04.009.

Phan TG and Croucher PI. The Dormant Cancer Cell Life Cycle. *Nat Rev Cancer* 2020;20(7):398–411; doi: 10.1038/s41568-020-0263-0.

Pierini A, Bocci G, Giorgi M, et al. From Humans to Dogs and Back: The Translational Lesson of Metronomic Chemotherapy. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 2012;7(4):198–212; doi: 10.3844/ajavsp.2012.198.212.

Pierini A, Sartini I, Giorgi M, et al. Pharmacokinetics of Thalidomide in Dogs: Can Feeding Affect It? A Preliminary Study. *J Vet Sci* 2020;21(5):e60; doi: 10.4142/jvs.2020.21.e60.

Pires I, Garcia A, Prada J, et al. COX-1 and COX-2 Expression in Canine Cutaneous, Oral and Ocular Melanocytic Tumours. *J Comp Pathol* 2010;143(2–3):142–149; doi: 10.1016/j.jcpa.2010.01.016.

- Polton G, Finotello R, Sabattini S, et al. Survival Analysis of Dogs with Advanced Primary Lung Carcinoma Treated by Metronomic Cyclophosphamide, Piroxicam and Thalidomide. *Vet Comparative Oncology* 2018;16(3):399–408; doi: 10.1111/vco.12393.
- Prada J, Queiroga FL, Gregório H, et al. Evaluation of Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mast Cell Tumours. *J Comp Pathol* 2012;147(1):31–36; doi: 10.1016/j.jcpa.2011.09.007.
- Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, et al. Cox-2 Levels in Canine Mammary Tumors, Including Inflammatory Mammary Carcinoma: Clinicopathological Features and Prognostic Significance. *Anticancer Res* 2005;25(6B):4269–4275.
- Rabanal C, Ruiz R, Neciosup S, et al. Metronomic Chemotherapy for Non-Metastatic Triple Negative Breast Cancer: Selection Is the Key. *WJCO* 2017;8(6):437–446; doi: 10.5306/wjco.v8.i6.437.
- Rasmussen RM, Kurzman ID, Biller BJ, et al. Phase I Lead-in and Subsequent Randomized Trial Assessing Safety and Modulation of Regulatory T Cell Numbers Following a Maximally Tolerated Dose Doxorubicin and Metronomic Dose Cyclophosphamide Combination Chemotherapy Protocol in Tumour-bearing Dogs. *Vet Comparative Oncology* 2017;15(2):421–430; doi: 10.1111/vco.12179.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* 2001;414(6859):105–111; doi: 10.1038/35102167.
- Ribatti D. Cancer Stem Cells and Tumor Angiogenesis. *Cancer Lett* 2012;321(1):13–17; doi: 10.1016/j.canlet.2012.02.024.
- Romiti A, Cox MC, Sarcina I, et al. Metronomic Chemotherapy for Cancer Treatment: A Decade of Clinical Studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;72(1):13–33; doi: 10.1007/s00280-013-2125-x.
- Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Regulatory T Cells in the Blood: A New Marker of Surgical Stress. *Surg Today* 2013;43(6):608–612; doi: 10.1007/s00595-013-0517-5.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor Alpha-Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *J Immunol* 1995;155(3):1151–1164.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic Tolerance Maintained by CD25+ CD4+ Regulatory T Cells: Their Common Role in Controlling Autoimmunity, Tumor Immunity, and

Transplantation Tolerance. *Immunol Rev* 2001;182:18–32; doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1820102.x.

Scharovsky OG, Mainetti LE and Rozados VR. Metronomic Chemotherapy: Changing the Paradigm That More Is Better. *Curr Oncol* 2009;16(2):7–15.

Schrempp DR, Childress MO, Stewart JC, et al. Metronomic Administration of Chlorambucil for Treatment of Dogs with Urinary Bladder Transitional Cell Carcinoma. *J Am Vet Med Assoc* 2013;242(11):1534–1538; doi: 10.2460/javma.242.11.1534.

Shaked Y, Emmenegger U, Francia G, et al. Low-Dose Metronomic Combined with Intermittent Bolus-Dose Cyclophosphamide Is an Effective Long-Term Chemotherapy Treatment Strategy. *Cancer Res* 2005;65(16):7045–7051; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0765.

Sharabi A and Ghera NH. Breaking Tolerance in a Mouse Model of Multiple Myeloma by Chemoimmunotherapy. *Adv Cancer Res* 2010;107:1–37; doi: 10.1016/S0065-230X(10)07001-6.

Sheskin J. THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPRA REACTIONS. *Clin Pharmacol Ther* 1965;6:303–306; doi: 10.1002/cpt196563303.

Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, et al. The Lifestyle of Naturally Occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *Immunol Rev* 2006;212:60–73; doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00415.x.

Simsek C, Esin E and Yalcin S. Metronomic Chemotherapy: A Systematic Review of the Literature and Clinical Experience. *Journal of Oncology* 2019;2019:1–31; doi: 10.1155/2019/5483791.

Singh A and Settleman J. EMT, Cancer Stem Cells and Drug Resistance: An Emerging Axis of Evil in the War on Cancer. *Oncogene* 2010;29(34):4741–4751; doi: 10.1038/onc.2010.215.

Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor Activity of Thalidomide in Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 1999;341(21):1565–1571; doi: 10.1056/NEJM199911183412102.

Spugnini EP, Buglioni S, Carocci F, et al. High Dose Lansoprazole Combined with Metronomic Chemotherapy: A Phase I/II Study in Companion Animals with Spontaneously Occurring Tumors. *J Transl Med* 2014;12:225; doi: 10.1186/s12967-014-0225-y.

Tanaka H, Matsushima H, Mizumoto N, et al. Classification of Chemotherapeutic Agents Based on Their Differential in Vitro Effects on Dendritic Cells. *Cancer Res* 2009;69(17):6978–6986; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1101.

Teo SK, Colburn WA, Tracewell WG, et al. Clinical Pharmacokinetics of Thalidomide. *Clin*

Pharmacokinet 2004;43(5):311–327; doi: 10.2165/00003088-200443050-00004.

Tominaga M, Horiuchi Y, Ichikawa M, et al. Flow Cytometric Analysis of Peripheral Blood and Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells in Dogs with Oral Malignant Melanoma. *J VET Diagn Invest* 2010;22(3):438–441; doi: 10.1177/104063871002200317.

Treggiari E, Borrego JF, Gramer I, et al. Retrospective Comparison of First-line Adjuvant Anthracycline vs Metronomic-based Chemotherapy Protocols in the Treatment of Stage I and II Canine Splenic Haemangiosarcoma. *Vet Comparative Oncology* 2020;18(1):43–51; doi: 10.1111/vco.12548.

Tripp CD, Fidel J, Anderson CL, et al. Tolerability of Metronomic Administration of Lomustine in Dogs with Cancer. *J Vet Intern Med* 2011;25(2):278–284; doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0684.x.

Umansky V and Sevko A. Tumor Microenvironment and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Microenvironment* 2013;6(2):169–177; doi: 10.1007/s12307-012-0126-7.

Vignali DAA, Collison LW and Workman CJ. How Regulatory T Cells Work. *Nat Rev Immunol* 2008;8(7):523–532; doi: 10.1038/nri2343.

Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, et al. Immune Evasion in Cancer: Mechanistic Basis and Therapeutic Strategies. *Seminars in Cancer Biology* 2015;35:S185–S198; doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.004.

Vives M, Ginestà MM, Gracova K, et al. Metronomic Chemotherapy Following the Maximum Tolerated Dose Is an Effective Anti-Tumour Therapy Affecting Angiogenesis, Tumour Dissemination and Cancer Stem Cells. *Int J Cancer* 2013;133(10):2464–2472; doi: 10.1002/ijc.28259.

Wada S, Yoshimura K, Hipkiss EL, et al. Cyclophosphamide Augments Antitumor Immunity: Studies in an Autochthonous Prostate Cancer Model. *Cancer Res* 2009;69(10):4309–4318; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4102.

Wang J, Yang L, Yu L, et al. Surgery-Induced Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Expand Regulatory T Cells in Lung Cancer. *Oncotarget* 2017;8(10):17050–17058; doi: 10.18632/oncotarget.14991.

Wendelburg KM, Price LL, Burgess KE, et al. Survival Time of Dogs with Splenic Hemangiosarcoma Treated by Splenectomy with or without Adjuvant Chemotherapy: 208 Cases (2001-2012). *J Am Vet Med Assoc* 2015;247(4):393–403; doi: 10.2460/javma.247.4.393.

Xystrakis E, Boswell SE and Hawrylowicz CM. T Regulatory Cells and the Control of Allergic Disease. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6(2):121–133; doi: 10.1517/14712598.6.2.121.

Zacarias Fluck MF, Rico MJ, Gervasoni SI, et al. Low-Dose Cyclophosphamide Modulates Galectin-1 Expression and Function in an Experimental Rat Lymphoma Model. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56(2):237–248; doi: 10.1007/s00262-006-0176-0.

Zhang S, Pan S-B, Lyu Q-H, et al. Postoperative Regulatory T-Cells and Natural Killer Cells in Stage I Nonsmall Cell Lung Cancer Underwent Video-Assisted Thoracoscopic Lobectomy or Thoracotomy. *Chin Med J (Engl)* 2015;128(11):1502–1509; doi: 10.4103/0366-6999.157672.

Zhao J, Cao Y, Lei Z, et al. Selective Depletion of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells by Low-Dose Cyclophosphamide Is Explained by Reduced Intracellular ATP Levels. *Cancer Res* 2010;70(12):4850–4858; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0283.

Produzione scientifica

Fidanzio F, Corsini A, **Spindler KP**, Crosara S. Suspected Drinking Water Poisoning in a Domestic Kitten with Methemoglobinemia. Vet Sci. 2021;8(11):243. Published 2021 Oct 20. doi:10.3390/vetsci8110243.

Quintavalla F, **Spindler KP**, Aldigeri R, Fidanzio F. The Effect of Different Opioids on Acid-Base Balance and Blood Gas Analysis in Hospitalized Dogs. Front Vet Sci. 2022 Mar 17;9:802186. doi: 10.3389/fvets.2022.802186.

Cino M, Gariboldi EM, Stefanello D, **Spindler KP**, Ferraris EI, Morello EM, Bertola L, Maniscalco L, Martano M. Ki67 Index in Patnaik Grade 2/Kiupel Low-Grade Canine Cutaneous Mast Cell Tumors with Early Lymph Node Metastasis: A Descriptive Study. Vet Sci. 2023 Jul; 10(7): 436. doi: 10.3390/vetsci10070436.