

Mast Cell Biology

Charyl London DMV, Diplomate ACVIM Oncology

Mast cells were first identified by Paul Ehrlich in 1878 when he was researching several histological dyes and identified a new cell type named “Mastzelle” which contained cytoplasmic granules. Following their discovery, mast cells were believed to be primarily responsible for defense against parasites, as well as major contributors to such pathologic conditions as allergy and asthma, releasing large amounts of histamine and leukotrienes following IgE cross linking. However, current research indicates that mast cells also play an important role in innate and perhaps adaptive immunity, responding to bacterial and viral infections by producing large quantities of pro-inflammatory mediators (cytokines, chemokines, proteases) that promote local inflammatory responses and dendritic cell migration to draining lymph nodes¹⁻⁴. Additionally, mast cells are now known to participate in several normal physiologic processes, including wound healing, angiogenesis and tissue remodeling⁵.

1. Morphologic characteristics of mast cells

Mast cells are discrete round cells roughly 1-3x the size of a neutrophil. They possess a round to oval nucleus and distinct cytoplasmic granules that stain with dyes such as toluidine blue, Giemsa, and methylene blue. Such staining is due to the affinity of these basic dyes for the acidic proteoglycans contained in the mast cell granules. Some of these dyes assume a different color when bound by the granules than they do when staining nuclear DNA, so that the granules are often called "metachromatic." Although mast cells may be visualized on hematoxylin and eosin stained sections, the dyes described above are utilized to definitively characterize mast cells. Moreover, mast cell granules may not be visualized with stains such as Diff-Quick®, precluding identification on some cytologic specimens.

2. Development of mast cells

Immature mast cells expressing CD34+, CD117+ (Kit) and CD13+ are released from the bone marrow then and quickly migrate to target tissues, particularly those having primary contact with foreign antigens (skin, respiratory and gastrointestinal tracts)

Mast cells undergo terminal differentiation in the target tissues, and their ultimate phenotype is influenced by factors present in the local microenvironment^{6,7}. Cytokines important in the development and maturation of mast cells include IL-3, IL-6, IL-4, and stem cell factor (SCF, the ligand for Kit), among others⁸⁻¹⁴. In several species SCF stimulation of Kit signaling has been shown to be critical for mast cell development. For example, mice deficient in Kit or SCF have a near complete absence of mast cells, highlighting the importance of this pathway for mast cell development and survival^{15,16}. Once mature, their life span is estimated to be approximately 40 days, although survival times of up to one year have been reported. The frequency of mast cells in most tissues is very low (less than 5% of all cells) but varies from location to location¹⁷. In all species, mast cells tend to localize close to blood vessels and nerve endings, presumably strategically placed to influence local immune responses^{2,4,18}.

As previously mentioned, the local tissue microenvironment in which mast cells mature determines the subsequent functional capacities of these cells¹⁹. For example, mast cells in the mucosa of the gastrointestinal tract (termed mucosal mast cells) have chondroitin sulfate as their major granule proteoglycan and contain little histamine. In contrast, mast cells in the lung and serosa of body cavities (termed tissue mast cells) contain heparin as their major granule proteoglycan and produce large amounts of histamine. Experiments in mice suggest that the functional characteristics of mast cells are not fixed, as granule content can change if mast cells are moved from one environment to another. In summary, the precise nature of the mast cell and the mediators it can produce varies with its anatomic location and is probably regulated by the local cytokine environment.

3. Function of mast cells

Mature mast cells bind IgE on their cell surface through expression of the high affinity IgE receptor (FcεRI). Mast cells also express receptors for complement components (particularly C5a), bacteria (Toll-like receptors), and in some cases, LPS (CD14). The primary manner in which mast cells are activated is by cross linking of the FcεRI-bound IgE on their cell surface, leading to the release and production of various mediators including:

- a. Contents of granules such as histamine, heparin, chondroitin sulfate, mast cell proteases
- b. Lipid mediators such as prostaglandins, leukotrienes and platelet activating factor
- c. Cytokines such as TNFα, IL-3, IL-4, IL-5 and IL-6
- d. Growth factors such as VEGF

The mediators described above lead to several reactions including increased vascular permeability, vasodilation, smooth muscle spasm, pruritus, anticoagulation, and activation of eosinophils and neutrophils. Collectively these effects can lead to local hypersensitivity reactions, or more seriously, systemic hypersensitivity (anaphylactic shock). As such, mast cells have primarily been associated with allergic reactions/disorders. However, they are also key players in response to parasitic infection through their production of cytokines (IL-4/IL-13) that promote IgE production, histamine release that stimulates parasite expulsion from the gastrointestinal tract, and

production of eosinophil growth and chemotactic factors that recruit eosinophils to aid in parasite killing^{20,21}. Furthermore, there is now evidence that mast cells play an important role in the initiation of innate immune responses^{3,4}. Experiments in mice demonstrated that mast cells were important in initiating and sustaining neutrophil migration and activation in response to bacteria. Indeed, mast cells are often seen at sites of inflammation, as well as in reactive lymph nodes.

4. Biology of Canine Bone Marrow Derived Mast Cells

In both humans and mice, the study of mast cell biology has been greatly facilitated by the use of mast cells differentiated *in vitro* from bone marrow stem cells. These bone marrow derived cultured mast cells (BMCMCs) have been used to define the role of mast cells in diverse processes such as innate immune responses to bacterial infection, arthritis, and tumor angiogenesis. Our laboratory has demonstrated that canine BMCMCs can be differentiated from purified CD34+ cells under specific tissue culture conditions including the use of serum free medium as well as recombinant canine stem cell factor (SCF)^{22,23}. Interestingly, the conditions necessary to generate canine BMCMCs are similar to those necessary for the differentiation of human BMCMCs. The canine BMCMCs possess characteristics typical of mast cells found *in vivo*. This includes expression of cell surface markers (Kit, FcεRI, CD11b/CD18, CD44, CD45), granules containing IL-8 and MCP-1, degranulation and histamine release upon stimulation with chemicals or IgE cross-linking, and synthesis and release of a variety of chemokines, growth factors, cytokines and proteases (IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, MCP-1, GM-CSF, MIP1α, TGFβ1, RANTES, tryptase, VEGF, and MMP2/9). The ability of canine BMCMCs to synthesize and release various mediators suggests that similar to humans and mice, canine mast cells play a role in innate and acquired immunity, wound healing, and angiogenesis.

We confirmed that SCF/Kit signaling is important for the development, survival, proliferation, and function of canine BMCMCs. We found that similar to the case with human mast cells, IL-4 and IL-10, promote canine mast cell proliferation, likely via up-regulating Kit expression, while TGFβ1 suppressed canine mast cell proliferation, down-regulating both Kit and FcεRI. We also found that that low concentrations of rcSCF (5 ng/ml) supported canine mast cell survival, but not proliferation. This is close to the

reported biological concentration of SCF (3ng/ml) in human tissues, further supporting the notion that the biology of canine BMCMCs is similar to mast cells found *in vivo*.

Evidence generated by our laboratory and other research groups indicates that canine mast cells possess properties similar to those of human mast cells. These include the following: 1) canine and human BMCMCs require similar *in vitro* culture conditions for their generation, including CD34+ cell purification, SCF, and serum free media^{13,24}, while mouse BMCMCs require whole bone marrow and IL-3 for their differentiation and proliferation *in vitro*; 2) both canine and human mature mast cells do not express CD34²⁵, while mature mouse mast cells express CD34 which is associated with mast cell migration and tissue localization in this species²⁶; 3) in both canine and human, IL-4 and IL-10 promote mast cell proliferation¹³, while they inhibit mouse mast cell proliferation and induce mouse mast cell apoptosis^{27,28}; 4) both canine and human mast cells release significantly larger quantities of MCP-1 than mouse mast cells²⁹; 5) canine and human mast cells share a similar pattern of MMP2/MMP9 expression; and 6) canine and human mast cells release significantly smaller quantities of IL-6 than mouse mast cells²⁹. In summary, the canine BMCMCs will be a useful future resource to investigate the biology of canine mast cells, as well as to determine the factors that may contribute to malignant transformation of these cells.

References:

1. Metz M, Maurer M. Mast cells--key effector cells in immune responses. Trends Immunol 2007;28:234-241.
2. Wedemeyer J, Galli SJ. Decreased susceptibility of mast cell-deficient Kit(W)/Kit(W-v) mice to the development of 1, 2-dimethylhydrazine-induced intestinal tumors. Lab Invest 2005;85:388-396.
3. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. Nat Rev Immunol 2004;4:787-799.
4. Marshall JS, Jawdat DM. Mast cells in innate immunity. J Allergy Clin Immunol 2004;114:21-27.
5. Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. Vet Dermatol 2001;12:303-313.
6. Austen KF, Boyce JA. Mast cell lineage development and phenotypic regulation. Leuk Res 2001;25:511-518.
7. Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, et al. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. Cell 1990;633:213-224.
8. Lam V, Kalesnikoff J, Lee CW, et al. IgE alone stimulates mast cell adhesion to fibronectin via pathways similar to those used by IgE + antigen but distinct from those used by Steel factor. Blood 2003;102:1405-1413.
9. Dahl C, Saito H, Nielsen HV, et al. The establishment of a combined serum-free and serum-supplemented culture method of obtaining functional cord blood-derived human mast cells. J Immunol Methods 2002;262:137-143.

10. Xu X, Weksler-Zangen S, Pikarsky A, et al. Mast cells involvement in the inflammation and fibrosis development of the TNBS-induced rat model of colitis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:330-337.
11. Theoharides TC, Conti P. Mast cells: the JEKYLL and HYDE of tumor growth. *Trends Immunol* 2004;25:235-241.
12. Kirshenbaum A. Regulation of mast cell number and function. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14:497-516, v.
13. Kulka M, Metcalfe DD. High-resolution tracking of cell division demonstrates differential effects of TH1 and TH2 cytokines on SCF-dependent human mast cell production in vitro: correlation with apoptosis and Kit expression. *Blood* 2005;105:592-599.
14. Matsuzawa S, Sakashita K, Kinoshita T, et al. IL-9 enhances the growth of human mast cell progenitors under stimulation with stem cell factor. *J Immunol* 2003;170:3461-3467.
15. Galli SJ, Tsai M, Wershil BK. The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am J Pathol* 1993;142:965-974.
16. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Advances in Immunology* 1994;55:1-95.
17. Janssens AS, Heide R, den Hollander JC, et al. Mast cell distribution in normal adult skin. *J Clin Pathol* 2005;58:285-289.
18. Sur R, Cavender D, Malaviya R. Different approaches to study mast cell functions. *Int Immunopharmacol* 2007;7:555-567.
19. Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 1997;61:233-245.
20. Breathnach R, Donahy C, Jones BR, et al. Increased leukotriene B(4) production, complement C3 conversion and acid hydrolase enzyme concentrations in different leucocyte sub-populations of dogs with atopic dermatitis. *Vet J* 2006;171:106-113.
21. Lantz CS, Boesiger J, Song CH, et al. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 1998;392:90-93.
22. Lin TY, London CA. A functional comparison of canine and murine bone marrow derived cultured mast cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;114:320-334.
23. Lin TY, Rush LJ, London CA. Generation and characterization of bone marrow-derived cultured canine mast cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;113:37-52.
24. Okayama Y. Human cultured mast cells. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1053-1055.
25. Welker P, Schadendorf D, Artuc M, et al. Expression of SCF splice variants in human melanocytes and melanoma cell lines: potential prognostic implications. *Br J Cancer* 2000;82:1453-1458.
26. Brightling CE, Ammit AJ, Kaur D, et al. The CXCL10/CXCR3 Axis Mediates Human Lung Mast Cell Migration to Asthmatic Airway Smooth Muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1103-1108.
27. Bouton LA, Ramirez CD, Bailey DP, et al. Costimulation with interleukin-4 and interleukin-10 induces mast cell apoptosis and cell-cycle arrest: the role of p53 and the mitochondrion. *Exp Hematol* 2004;32:1137-1145.
28. Irby RB, Yeatman TJ. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 2000;19:5636-5642.
29. Nakajima T, Inagaki N, Tanaka H, et al. Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following Fcepsilon receptor I cross-linking: an interspecies comparison. *Blood* 2002;100:3861-3868.

Il mastocitoma: presentazione, segni clinici e fattori prognostici clinici

Fabio Valentini, DVM, MS

f.valentini@email.it

Il mastocitoma (MCT) è il tumore cutaneo più comune nel cane (16-21% di tutte le neoplasie cutanee); l'età media di insorgenza è di 9 anni e le razze più predisposte risultano essere i boxer, beagle, labrador, boston terrier, schnauzer.

I MCTs cutanei hanno una presentazione clinica estremamente eterogenea e possono “mimare” l'aspetto di altre lesioni traendo in inganno sulla prima ipotesi diagnostica.

Nella maggior parte dei casi la lesione è solitaria ma circa l'11-14% dei soggetti si presenta con lesioni multiple.

Clinicamente le forme “ben differenziate” tendono ad essere solitarie, hanno dimensioni che vanno da 1 a 4 cm circa di diametro, tendono a crescere lentamente ed hanno consistenza elastica. Solitamente non sono ulcerate ma possono presentarsi alopeciche. Bisogna fare attenzione alle forme sottocutanee che, a causa del loro aspetto soffice, vengono spesso confuse per lipomi o ascessi. Per evitare questo grossolano errore è sufficiente eseguire sempre una semplice biopsia ad ago sottile.

Le forme “indifferenziate” tendono ad avere una crescita rapida e quindi raggiungere dimensioni importanti, si ulcerano spesso e provocano irritazione e dolore. I tessuti vicini, causa, rilascio di sostanze “biologicamente attive”, si presentano eritematosi, edematosi e le ulcere spesso presentano gemizi di sangue continui.

Tra queste due categorie ci sono le forme “mediamente differenziate”.

Il segno clinico più caratteristico è quello noto col nome di “segno di Darier”: si tratta dell'eritema e dell'edema che si forma intorno alla lesione in seguito al rilascio, da parte del tumore, di amine vaso-attive (istamina) conseguenti, spesso, alla manipolazione (da parte del medico) o al leccamento (da parte del cane che sente prurito) del tumore stesso. L'attivazione dei recettori H_2 situati sulle cellule parietali gastriche da parte dell'istamina rilasciata dal tumore, è responsabile dell'aumento di secrezione di HCl e quindi è causa di iperacidità; l'istamina incrementa la motilità gastrica e la permeabilità capillare e questo favorisce la trombosi intravascolare e l'ulcerazione della mucosa. Tutto ciò si manifesta clinicamente con vomito, anoressia, melena e dolore addominale. Localmente si rileva ritardo nella guarigione delle ferite (rilascio di enzimi proteolitici da parte dei mastociti e di *fibroblast suppressor factors* da parte dei macrofagi in seguito al legame istamina-recettori H_1 e H_2) e gemizi di sangue che coagulano con difficoltà (rilascio di eparina). Qualora il rilascio di istamina non fosse localizzato alla sede peritumorale ma sistemico (manipolazione di grosse masse), il legame con i recettori H_1 e H_2 localizzati nei vasi sanguigni può essere responsabile di ipotensione, mentre l'attivazione degli stessi recettori a livello cardiaco è responsabile di aritmie; il broncospasmo si manifesta per attivazione dei recettori H_1 localizzati sulla muscolatura liscia.

La maggior parte dei MCTs cutanei nel cane si localizza nel tronco (50%), la seconda sede più colpita è quella degli arti (40%) e più rare invece le localizzazioni nel testa/collo (10%).

Oltre alla forma cutanea esiste anche una forma viscerale detta “mastocitosi disseminata o sistemica”. Di solito questa forma è successiva ad una lesione anaplastica cutanea

primaria. Da un punto di vista clinico si rileva linfadenomegalia, epato- e splenomegalia; si può avere invasione ematica e midollare e si possono rilevare mastociti neoplastici nei versamenti. Recentemente è stata riportata una serie di cani con mastocitoma intestinale.

Fattori prognostici clinici: lo stadio clinico 0 e 1 (tumore confinato al derma e senza metastasi) sono associati a prognosi migliore rispetto agli stadi successivi; anche alcune localizzazioni anatomiche sembrano preferire l'insorgenza di forme poco differenziate di alto grado e quindi più aggressive; tra queste ricordiamo prepuzio, inguine, perineo, cavità orale, scroto, letto sub-ungueale, membrane mucose. Lesioni riferite come "cresciute rapidamente" vanno sempre guardate con preoccupazione rispetto, invece, a masse o noduli presenti da più di sei mesi. La velocità di crescita, quindi, è un fattore prognostico negativo. Allo stesso modo se la lesione è associata o meno a segni clinici sistemici (anoressia, vomito, melena, ulcere gastro-intestinali, eritema ed edema diffuso, ulcerazione della massa neoplastica) la prognosi sarà peggiore o migliore rispettivamente. Dai principi di chirurgia oncologica sappiamo che il primo intervento è quello più importante e che ogni intervento successivo al primo, perde di efficacia nei confronti del controllo locale della malattia; per questo motivo la recidiva locale dopo il primo tentativo chirurgico non è considerata un fattore prognostico positivo.

Sempre rimanendo in campo chirurgico, anche le dimensioni del tumore giocano un ruolo chiave: tanto maggiore sono le dimensioni della massa, tanto più difficoltoso è per il chirurgo ottenere dei margini di escissione puliti e quindi esenti da cellule neoplastiche e tanto peggiore sarà la prognosi. Le dimensioni della massa, però, giocano un ruolo anche nei confronti della chemioterapia: maggiore le dimensioni della massa, minore la quota di cellule sensibile all'azione citotossica dei chemioterapici, minore l'efficacia di questi ultimi, peggiore la prognosi.

Per quanto riguarda la predisposizione di razza, sembra che i boxer siano colpiti prevalentemente da forme di grado basso o intermedio e che quindi abbiano una prognosi tutto sommato migliore ad altre razze.

In ultimo bisogna ricordare che il numero delle lesioni non è correlato alla prognosi: un soggetto con 5-6 lesioni cutanee privo di coinvolgimento splancnico, ematico o midollare ha una prognosi migliore rispetto ad un soggetto con una lesione cutanea solamente ma che ha già dato coinvolgimento ad altri organi.

Mastocitoma: stadiazione clinica

Laura Marconato, DVM, DECVIM-CA (Oncology)

lauramarconato@yahoo.it

La stadiazione clinica del mastocitoma (MCT) nel cane è oggetto di notevoli controversie, e ancora oggi non è stato raggiunto un accordo mondiale sugli esami ritenuti essenziali.

Secondo la classificazione WHO, esistono 5 stadi clinici in cui inserire i pazienti con MCT. La stadiazione è stabilita valutando il tumore primitivo e la presenza di metastasi regionali (stadio II) e a distanza (stadio IV). Il principale limite della stadiazione proposta riguarda la definizione di III stadio, in assoluto il più controverso. Lo stadio III viene attribuito a pazienti che mostrano tumori dermici multipli oppure un unico tumore infiltrante e voluminoso con o senza metastasi al linfonodo satellite, senza tuttavia definire “infiltrante” e “voluminoso”.

In generale, a stadio clinico crescente corrisponde maggiore malignità. Per quanto riguarda i MCT del cane, questa regola non è sempre supportata da riscontri pratici; è stato infatti più volte dimostrato che i MCT multipli (stadio III) non necessariamente si comportano in maniera più aggressiva di un unico MCT con metastasi regionali (stadio II).

Recentemente è stata proposta una nuova stadiazione clinica per mastocitomi dermici del cane (Consensus Panel, Worldvetcancer, Copenhagen, 2008).

Stadio	MCT	LN regionale	Metastasi distanti
Ia	Un singolo MCT, confinato alla cute, ben circoscritto, <3 cm.	no	no
Ib	Più di un MCT (distanza interlesionale >10 cm), confinati alla cute, ben circoscritti, <3 cm.	no	no
II	Uno o più MCT, >3 cm oppure	no	no

	mal definiti, oppure ulcerati o con metastasi satelliti (distanza interlesionale <10 cm).		
III	qualsiasi	sì	no
IV	qualsiasi	qualsiasi	sì

Una volta emessa diagnosi di mastocitoma cutaneo, quali esami richiedere?

Innanzitutto è sempre indicato l'esame citologico del linfonodo regionale, anche se l'interpretazione è spesso difficoltosa, dal momento che non sono stati determinati cut-off per stabilire al di sopra di quale percentuale il linfonodo è da considerarsi metastatico. In linea generale, la presenza di aggregati di mastociti,¹ o di mastociti scarsamente differenziati è suggestivo di metastasi. La morfometria nucleare,² così come l'espressione immunocitochimica di KIT, potrebbero aiutare il patologo clinico nel differenziare mastociti reattivi da mastociti neoplastici.

Per valutare lo stato generale del paziente ed escludere eventuali sindromi paraneoplastiche, è importante eseguire esame emocromocitometrico, ematochimica e profilo coagulativo, quest'ultimo utile soprattutto in previsione di un intervento chirurgico, dal momento che i MCT possono liberare eparina e determinare anomalie di coagulazione.

La valutazione del buffy coat non sembra essere particolarmente utile dal momento che, se negativo, non consente di escludere infiltrazione midollare e, se positivo, non è patognomonico di infiltrazione viscerale o midollare.

La valutazione citologica del midollo osseo è indicata se si riscontrano anomalie dell'emocromocitometrico (neutrofilia, monocitosi, eosinofilia, basofilia, anemia, trombocitopenia),³ mastociti circolanti o se sono interessati i visceri. Secondo diversi studi, infatti, nel 56% delle forme viscerali e nel 4,5% dei MCT cutanei del cane era evidente infiltrazione neoplastica midollare.³ Tuttavia, vi può essere infiltrazione midollare anche in assenza di anomalie periferiche.⁴ Per questo motivo l'autore suggerisce di valutare sempre il midollo osseo nel caso in

cui si voglia somministrare chemioterapia. Infatti, l'infiltrazione midollare comporta di per sé una ridotta funzionalità ematopoietica, inoltre, la somministrazione di chemioterapici citotossici potrebbe esacerbare la mielosoppressione.⁴

In genere il midollo osseo è considerato infiltrato, se i mastociti sono >10 per 1000 cellule nucleate, oppure se si riscontrano mastociti atipici. Si vuole tuttavia puntualizzare che la presenza di un numero limitato di mastociti è rinvenibile anche in cani normali, sia nel midollo osseo, sia nei linfonodi, sia nel sangue, oppure in corso di alcune patologie, tra cui parvovirosi, infiammazioni cutanee (allergia da morso di pulce, atopia, intolleranza alimentare, rogna sarcoptica), glomerulonefriti, necrosi pancreatica o grave anemia rigenerativa, pertanto si deve essere cauti nell'emettere una diagnosi di infiltrazione neoplastica.

La radiografia del torace è fondamentale per escludere o confermare la presenza di metastasi polmonari, mentre la radiografia o, meglio, l'ecografia addominale valuta l'integrità dei visceri; quest'ultima consente, se necessario, di prelevare campioni per la valutazione citologica. Alcuni autori suggeriscono di prelevare campioni citologici epatici e splenici in ogni caso, anche in assenza di lesioni ecograficamente evidenziabili, soprattutto per MCT di III grado.⁵ Tale suggerimento non è però accettato da tutti, dal momento che diventa complicato accertare la natura neoplastica degli eventuali mastociti riscontrati in organi morfologicamente e strutturalmente inalterati.⁶ Di nuovo, vale quanto detto in merito al linfonodo regionale: la presenza di aggregati di mastociti, o di mastociti atipici è suggestivo di infiltrazione metastatica.

Una volta stadiato il tumore, è possibile formulare prognosi e proporre il trattamento più indicato.

Riferimenti bibliografici selezionati

1. Thamm DH, Turek MM, Vail DM: Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases.
J Vet Med Sci 2006, 68(6):581-7

2. Marconato L, Marchetti V, Francione D, et al. Cytomorphomeytrical approach for predicting regional lymph node micrometastatic load in canine mast cell tumors: preliminary results. *Vet & Comp Onc.* In press.
3. Endicott MM, Charney SC, McKnight JA, et al. Clinicopathological findings and results of bone marrow aspiration in dogs with cutaneous mast cell tumours: 157 cases (1999-2002). *Vet & Comp Onc.* 2007, 5(1):31-37
4. Marconato L, Bettini G, Giacoboni C, et al. Clinico-pathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. *J Vet Intern Med* 2008; 22:1001-1007.
5. Fan TM, de Lorimier LP. Treatment options for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Med* 2005; 272-284
6. Finora K, Leibman NF, Fettman MJ, et al. Cytological comparison of fine-needle aspirates of liver and spleen of normal dogs and of dogs with cutaneous mast cell tumours and an ultrasonographically normal appearing liver and spleen. *Vet & Comp Onc.* 2006, 4(3):178-183

Mastocitoma: citologia, colorazioni citochimiche ed immunocitochimiche

M. Caniatti DVM, Dipl ECVP

mario.caniatti@unimi.it

Premessa

Il mastocitoma, fra i più comuni tumori cutanei del cane e non raro nel gatto, è una neoplasia di facile diagnosi citologica che viene classificato all'interno del grande gruppo dei cosiddetti "tumori a cellule rotonde" che di solito esfoliano con maggiore facilità in confronto alle altre classi citologiche di neoplasie (tumori epiteliali e tumori a cellule fusate).

Le neoplasie a cellule rotonde sono costituite da un relativamente contenuto numero di neoplasie, di cui le più importanti sono: mastocitoma, linfoma, istiocitoma, tumore venereo trasmissibile, plasmocitoma e, per alcuni autori, anche il melanoma che però si presenta solo occasionalmente come tumore a cellule rotonde. Altre neoplasie possono avere i caratteri citologicamente riferibili a tumori a cellule rotonde (es. osteocondrosarcomi, alcuni tumori epiteliali indifferenziati...), ma si tratta di condizioni rare che possono tuttavia essere causa di errori diagnostici.

In generale le neoplasie a cellule rotonde mostrano caratteristiche citologiche comuni costituite da:

1-Cellularità ottima (solo l'istiocitoma del cane giovane fa spesso eccezione). La buona cellularità dei campioni è causata dal fatto che le "cellule rotonde" non hanno apparati di adesione (es. desmosomi) come hanno invece le cellule epiteliali o, in alternativa, sostanza fondamentale che le cementa come nel caso dei tumori mesenchimali a cellule fusate.

2-Cellule singole che tendono a disporsi in "monostrato" sul fondo del vetrino. Quando i campioni sono molto cellulari è possibile che il monostrato possa mimare la presenza di gruppi di cellule coesive dando l'impressione di trovarsi di fronte ad ammassi di cellule epiteliali.

3-Cellule di forma rotonda

4-Nucleo di forma tendenzialmente rotonda

5-Criteri di malignità spesso inutili per definire la malignità o meno della neoplasia. Per esempio i linfomi, tumori sempre maligni, possono avere relativamente scarsi criteri di malignità. Per contro l'istiocitoma del cane giovane, tumore benigno, mostra quasi sempre criteri citologici di atipia cellulare più o meno marcata. Il mastocitoma cutaneo del cane, ben caratterizzato in termini di grading istologico, può avere potenziale metastatico anche nelle forme meglio differenziate.

6-Facilità di tipizzazione citologica della neoplasia. I più classici tumori a cellule rotonde hanno caratteri citologici abbastanza tipici.

Caratteri citologici del mastocitoma

La diagnosi citologica di mastocitoma è nella maggior parte dei casi piuttosto facile. I caratteri citologici che la permettono sono legati alla triade: buona cellularità del campione, presenza di cellule rotonde come popolazione dominante, nonché più o meno numerosi granuli citoplasmatici (ma anche sparsi sul fondo del vetrino a seguito di rottura delle cellule durante le operazioni di striscio del campione) di colore porpora (a volte viola scuro). I granuli sono di dimensioni maggiori e di taglia un po' più variabile nel cane rispetto al gatto. Nei mastocitomi i granuli possono essere scarsi, se non assenti, nel caso di mastocitomi poco differenziati/indifferenziati e questo crea grossi problemi di diagnosi citologica. Altre volte i granuli sono presenti, ma occasionalmente risultano poco o a volte niente colorati nel caso in cui il vetrino sia stato sottoposto a colorazione rapida tipo Romanowsky (es. Hemacolor®, Diff-Quik®) invece che alle classiche colorazioni come May-Grünwald Giemsa (MGG), Wright ecc. Ciò avviene con particolare frequenza nei mastocitomi viscerali del gatto, ma non è raro osservare il fenomeno anche nei mastocitomi del cane. In questi casi è interessante notare come nei mastocitomi viscerali del gatto, al posto dei granuli, spesso si osservano vacuoli otticamente vuoti che fanno insospettire il citologo. Questo reperto di vacuoli otticamente vuoti non si osserva invece nel mastocitoma del cane che, in queste circostanze, risulta più difficile da diagnosticare citologicamente. Da questo ne derivano, nel caso di campioni citologici canini colorati con una colorazione rapida, due importanti considerazioni:

-Un tumore indifferenziato a cellule rotonde potrebbe nascondere un mastocitoma anche ben differenziato che può essere svelato sottoponendo il campione a una colorazione

lunga tipo Wright o MGG oppure ricolorando il vetrino con la colorazione rapida avendo l'accortezza di allungare i tempi di colorazione dei liquidi 1 (fissativo) o 3 (colorante blu) della colorazione rapida.

-Un mastocitoma caratterizzato da scarsi granuli non va mai e poi mai diagnosticato come “poco differenziato”. Un allungamento dei tempi di colorazione nei liquidi 1 e 3, come pure una ricolorazione con Wright o MGG potrebbe mettere in luce mastociti contenenti numerosissimi granuli citoplasmatici.

I campioni citologici di mastocitoma, soprattutto nella specie canina, sono spesso accompagnati da eosinofili e/o da fibroblasti assai reattivi.

La presenza di eosinofili, pur priva di significato prognostico, è un reperto che può avere una certa utilità nei casi di mastocitoma poco differenziato in cui vi siano pochi granuli citoplasmatici o nel caso di granuli poco colorati. In questi casi infatti gli eosinofili agiscono come indizio per approfondire la ricerca dei granuli attraverso l'utilizzo di un maggiore ingrandimento (es. immersione, X1000) oppure attraverso la colorazione con Wright o MGG.

La presenza di fibroblasti nei campioni di mastocitoma è relativamente comune. In alcuni casi questi fibroblasti sono assai reattivi e mostrano criteri di atipica citologica anche di un certo rilievo. Questo impone una possibile diagnosi differenziale con altri tipi di neoplasie (es. sarcomi) che non di rado possono contenere una componente data da mastociti a loro volta reattivi.

La ricerca dei mastociti nei campioni citologici non è solo diretta nei confronti di una diagnosi di neoplasia, ma anche nel corso di stadiazione delle neoplasie dei mastociti. Per questa ragione è frequente il prelievo da vari organi (linfonodo regionale, milza, fegato, midollo osseo, sangue). In alcuni di questi organi la difficoltà è spesso quella di distinguere mastociti associati al connettivo dell'organo oppure reattivi, in opposizione a mastociti neoplastici.

Tecniche citochimiche (es. AgNor) o immunocito/istochimiche (CD117) vengono utilizzate su campioni citologici o istologici non tanto per la diagnosi, ma soprattutto a scopi prognostici e terapeutici.

Istopatologia e fattori prognostici istopatologici nel gatto

Elvio Lepri, DVM, PhD, Dipl.ECVP

elvio.lepri@unipg.it

Le diverse forme anatomiche di mastocitoma riscontrate nel gatto hanno caratteri anatomopatologici, istologici e probabilmente istogenetici differenti che possono giustificare il diverso comportamento biologico.

Il **mastocitoma cutaneo felino (CMT)** si può presentare con noduli, ulcere o placche sopraelevate, in diverse sedi, più comunemente su testa e arti. Sebbene spesso benigni, è opinione di molti autori che i CMT felini vadano considerati potenzialmente maligni, in quanto il comportamento biologico non è facilmente prevedibile sulla base dei caratteri macroscopici od istologici. I parametri di importanza prognostica da valutare per il grading sono sia macroscopici che microscopici: tra i primi sede, numero e dimensioni delle neoplasie, tempo di insorgenza, presenza o assenza di metastasi; i secondi indice mitotico, quantità ed affinità tintoriale dei granuli citoplasmatici e caratteri di anaplasia cellulare.

Istologicamente sono descritte due tipi di CMT: quello tipico (definito *mastocitico*) e quello atipico scarsamente granulato (detto anche *istiocitico*).

Il classico mastocitoma mastocitico del gatto è un tumore generalmente ben differenziato, costituito da cellule rotonde od ovalari con tipico aspetto “a uovo fritto”, ampio citoplasma eosinofilo finemente granulare, nucleo centrale rotondo e nucleolo singolo e prominente. Non mancano tuttavia casi in cui le cellule sono caratterizzate da maggior anisocitosi ed anisocariosi, con cellule di grandi dimensioni e forma bizzarra, tanto da essere definiti mastocitomi pleomorfi¹; questi maggiori caratteri di atipia cellulare non sembrano tuttavia correlati ad un comportamento biologico più aggressivo, come invece evidenziato nel cane, ed il tentativo di applicare anche al gatto lo schema di grading di Patnaik applicato al cane non ha fornito risultati incoraggianti².

Il tumore si accresce nel derma superficiale senza un apparente continuità con la sovrastante epidermide, da cui resta separato da uno strato di connettivo compresso chiamato “zona di Grenz”, seppure occasionalmente singoli mastociti neoplastici possano spingersi in superficie fino ad infiltrare l'epidermide. Il tumore è composto da foglietti

compatti, con scarso stroma rappresentato da fibre connettivali dermiche residue, e tende a dislocare gli annessi cutanei; in periferia la crescita può essere da espansiva e ben delimitata, seppur non capsulata, ad estremamente infiltrante; rispetto al corrispettivo tumore canino, tuttavia, la crescita infiltrativa avviene in un tessuto dermico compatto non edematoso e tende ad essere più confinata. In un numero inferiore di casi la crescita è invece prevalentemente diffusa e non nodulare. Sulla base di queste caratteristiche è possibile individuare tumori *compatti nodulari*, *compatti infiltrativi* e *diffusi*, caratterizzati da progressivo aumento della probabilità di recidiva locale dopo asportazione non adeguata.

Alla periferia della neoplasia, o disseminati in sede perivasale all'interno del tumore, possono riscontrarsi infiltrati linfocitari, talora formanti aggregati similfollicolari con centri germinativi evidenti. Il significato biologico di tali infiltrati, e quindi il loro potenziale significato prognostico, tuttavia, non è ancora chiaro.

Uno dei fattori più importanti per prevedere il comportamento biologico dei mastocitomi del gatto è l'attività mitotica: la presenza di più di due mitosi/hpf è spesso associata ad un comportamento biologico aggressivo con metastasi o recidiva³.

L'infiltrazione eosinofilia rappresenta un rilievo incostante, comunque non imponente, nei CMT felini. Caratteri morfologici ulteriori sono la presenza di cellule giganti bi- o multinucleate con numerosi nuclei omogenei regolarmente disposti a corona, e l'occasionale evidenziazione di fenomeni di eritrofagocitosi.

Sul piano immunoistochimico i CMT sono positivi a triptasi e KIT, e presentano generalmente una buona reazione alla reazione per la cloroacetato esterasi (CAE) indice di attività chimasica dei granuli.

Discorso a parte merita il c.d. *mastocitoma istiocitico*, in cui solo una bassa percentuale di cellule (in genere < 20%) presenta caratteri morfologici riferibili a mastociti, mentre la maggior parte delle cellule ha ampio citoplasma pallido con granulazioni difficili da intravedere, anche con le comuni colorazioni istochimiche (blu di toluidina, giemsa, PAS). Tali cellule, riferibili a mastociti immaturi o degranulati, si trovano frammiste ad una popolazione mista di linfociti, plasmacellule e granulociti neutrofili ed eosinofili, che mima una reazione infiammatoria di tipo granulomatoso. In questi rari casi il ricorso all'immunoistochimica o alla microscopia elettronica può risolvere il dilemma

diagnostico. Il CMT istiocitico ha comportamento biologico benigno con casi segnalati di regressione spontanea.

Solo il tipo cellulare (mastocitico vs istiocitico) e l'attività mitotica ($>2/\text{hpf}$) rappresentano fattori prognostici riconosciuti per il CMT felino; il modello di crescita diffuso o compatto infiltrativo potrebbe essere associato ad una maggior probabilità di recidiva locale³.

I mastocitomi viscerali presentano caratteri anatomo-istopatologici diversi in dipendenza della localizzazione.

Nel **mastocitoma splenico o sistemico (SMCT)** si osserva una splenomegalia generalmente uniforme, raramente nodulare. La polpa rossa, e secondariamente la polpa bianca, sono completamente sostituite da una popolazione omogenea di mastociti con aspetto classico o leggermente allungato, citoplasma granulare ed intensamente metacromatico. Non è infrequente evidenziare fenomeni di eritrofagocitosi da parte di mastociti neoplastici; tale reperto potrebbe in parte giustificare l'anemia spesso clinicamente evidente. Non si evidenziano infiltrati eosinofili. Anche in questa forma neoplastica le cellule sono generalmente positive a triptasi, KIT e CAE.

I **mastocitomi intestinali (IMCT)** presentano un elevato polimorfismo istologico che rende talora difficoltosa la differenziazione da altri tumori intestinali, principalmente il linfoma.

Essi sviluppano primitivamente nella tonaca sottomucosa e muscolare e tendono in seguito ad invadere la mucosa, a differenza dei linfomi che spesso originano nella mucosa infiltrando in secondo momento le tonache profonde. Le cellule neoplastiche possono avere forma da rotonda ad ovale fino a nettamente allungata, simili a cellule fusate, con rapporto nucleo-citoplasma variabile, nuclei da rotondi ad ovali, con nucleoli evidenti. Sono comuni le cellule bi e multinucleate e le figure mitotiche, così come i fenomeni necrotici ed emorragici, con infiltrato eosinofilo da assente a marcato. La caratteristica dei mastocitomi intestinali è la scarsa o nulla metacromasia citoplasmatica, che rende talora la diagnosi difficile se non impossibile senza il ricorso ad opportune colorazioni immunoistochimiche (triptasi). In molti casi i tumori sono CAE negativi ed hanno una immunoreattività nei assai variabile, in genere scarsa, nei confronti di KIT.

L'eterogeneità morfologica dei mastocitomi intestinali, tuttavia, non si ripercuote sulle

caratteristiche biologiche del tumore, la cui prognosi è sfavorevole indipendentemente dai caratteri istologici.

Tabella 1: CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA DEI CMT NEL GATTO ⁴

TIPO	SOTTOTIPO	DESCRIZIONE MICROSCOPICA
TIPICO <i>(MASTOCITICO)</i>	COMPATTO (BEN DIFFERENZIATO)	Cordoni e nidi omogenei di mastociti tipici, con nuclei basofili rotondi e centrali, ampi citoplasmi eosinofili, e margini cellulari distinti. Infiltrato eosinofilico evidente solo nel 50% dei casi
	DIFFUSO (ANAPLASTICO)	Meno delimitato, infiltrante nel sottocute, con nuclei più grandi (>50% del volume cellulare). 2-3 mitosi/HPF. Marcata anisocitosi, incluse cellule giganti sia mononucleate che multinucleate. Infiltrati di eosinofili osservati più comunemente.
ATIPICO SCARSAMENTE GRANULATO <i>(ISTIOCITICO)</i>		Foglietti di cellule simil-istiocitarie con granuli citoplasmatici non sempre ben evidenti. Aggregati linfoidi e granulocitari eosinofilici disseminati nel tumore. Granuli prontamente evidenziabili in alcuni lavori, apparentemente assenti in altri.

Bibliografia

1. Johnson TO, Schulman FY, Lipscomb TP, et al. Histopathology and biologic behavior of pleomorphic cutaneous mast cell tumors in fifteen cats. Vet Pathol 2002;39:452-457;
2. Molander-McCrary H, Henry CJ, Potter K, et al. Cutaneous mast cell tumors in cats: 32 cases (1991-1994). J Am Anim Hosp Assoc 1998;34:281-284;
3. Lepri E, Ricci G, Leonardi L, et al. Diagnostic and prognostic features of feline cutaneous mast cell tumours: a retrospective analysis of 40 cases. Vet Res Commun 2003;27 Suppl 1:707-709;
4. Vail DM: Mast Cell Tumor. In Withrow SJ e MacEwen EG (eds) Small Animal Clinical Oncology 2nd 1996 Saunders, Philadelphia

Istopatologia, grading e fattori prognostici istopatologici del mastocitoma nel cane

Giuliano Bettini, DMV

giuliano.bettini@unibo.it

Il mastocitoma del cane generalmente non pone al patologo grossi problemi diagnostici. Molto spesso l'esame istologico è stato preceduto da un esame citologico, che nel mastocitoma ha un'attendibilità diagnostica molto elevata, e in questo caso la diagnosi istologica ha sostanzialmente un significato di conferma. Quando invece non si hanno informazioni pregresse e il tessuto esaminato è rappresentato da una biopsia oppure da un nodulo asportato chirurgicamente, nella maggior parte dei casi la tipicità del quadro istologico è sufficiente a raggiungere la diagnosi in tempi brevi. In sintesi, gli elementi istomorfologici che meglio caratterizzano il mastocitoma del cane sono: neoplasia a cellule rotonde, nuclei rotondeggianti centrali o paracentrali, citoplasma debolmente eosinofilo contenente granuli debolmente colorati grigio-blu in ematossilina-eosina e viola con i metodi metacromatici (es blu toluidina, Giemsa); compresenza di numerosi granulociti eosinofili e multifocali aspetti di collagenolisi.

La differenziazione (ovvero la quantità di granuli citoplasmatici), il pleomorfismo nucleare, il numero di mitosi e l'infiltrazione dei tessuti circostanti possono variare notevolmente da caso a caso, ed è sulla base di questi parametri che è formulato il **grading istologico** dei mastocitomi, la cui espressione generalmente accompagna la diagnosi istologica di mastocitoma. Il sistema di grading istologico più utilizzato per giudicare la malignità del mastocitoma del cane fa riferimento allo schema proposto nel 1984 da Patnaik et al. (Vet Pathol 21:469–74), che è tuttora considerato il parametro prognostico più attendibile. Esso prevede:

- *Mastocitomi di grado I* (mastocitomi ben differenziati, composti da mastociti con limiti citoplasmatici ben definiti, nuclei sferoidali o ovoidali regolari, figure mitotiche rare o assenti, granuli numerosi ben evidenti e intensamente colorati, in cui la proliferazione neoplastica è limitata al derma e/o agli spazi interfollicolari): considerati a comportamento relativamente benigno, nelle casistiche rappresentano il 30-50% dei mastocitomi; l'escissione chirurgica completa è curativa nella maggior parte dei casi (75-90%);

- *Mastocitomi di grado II* (mastocitomi a differenziazione intermedia, composti da mastociti fittamente stipati frammisti a sottili setti connettivali, con limiti citoplasmatici poco definiti, citoplasma da scarso a moderato contenente granuli metacromatici in moderata quantità, ma comunque ben apprezzabili, moderato pleomorfismo nucleare, figure mitotiche poco frequenti, comunque inferiori a due per

campo a forte ingrandimento, in cui la proliferazione neoplastica è poco circoscritta e tende a infiltrare derma profondo e sottocute): rappresentano nelle casistiche il 25-50% dei casi, e hanno un comportamento biologico incerto; l'atteggiamento infiltrante comporta maggiori difficoltà di escissione chirurgica, e conseguentemente la rimozione non sempre è completa; l'escissione chirurgica risulta infatti curativa nel 40%; in una percentuale variabile di casi c'è metastatizzazione linfonodale e sistemica; la sopravvivenza media si attesta intorno ai 6-7 mesi;

- *Mastocitomi di grado III* (mastocitomi poco differenziati, composti da colate di mastociti fittamente stipati, con limiti cellulari spesso indefiniti, cellule di forma irregolare, con scarso citoplasma contenente pochi granuli, spesso apprezzabili solo col ricorso a colorazioni metacromatiche, marcato pleomorfismo nucleare e nucleolare, figure mitotiche frequenti, in numero superiore a 3 per campo a forte ingrandimento, anche atipiche, in cui la proliferazione neoplastica si estende in modo cospicuo al sottocute e agli strati più profondi): rappresentano nelle casistiche il 20-40% dei mastocitomi cutanei e si comportano in modo molto aggressivo, mostrando metastasi precoci nella maggior parte dei casi; la sopravvivenza media è di 3-4 mesi e la percentuale di sopravvivenza a lungo termine dopo l'escissione chirurgica non supera il 6-7% dei casi.

Il limite principale del grading di Patnaik risiede nella soggettività interpretativa. Gli studi in cui patologi diversi hanno giudicato una stessa serie di mastocitomi hanno infatti evidenziato una elevata discordanza, anche fino al 50% dei casi, soprattutto nell'attribuzione del grado intermedio (mastocitomi di grado II). Questa variabilità è verosimilmente la causa principale del comportamento biologico incerto dei mastocitomi di grado II, e per questo motivo la ricerca attuale si concentra sull'individuazione di elementi che permettano di discriminare i mastocitomi di grado II a comportamento benigno (che potrebbero essere considerati mastocitomi di grado I) dai mastocitomi di grado II a comportamento maligno (da considerare analoghi ai mastocitomi di grado III). Fra i vari parametri istologici presi in considerazione, i risultati più promettenti si sono finora ottenuti con la valutazione degli AgNOR e dell'antigene Ki67. Entrambe le tecniche forniscono informazioni sulla cinetica cellulare del mastocitoma, ma con metodiche e presupposti diversi.

Gli **AgNOR** (proteine argirofile associate agli organizzatori nucleolari) sono regioni nucleari evidenziabili con una colorazione istochimica di impregnazione argantica coinvolte nella replicazione cellulare: maggiore è la quantità di AgNOR, minore è il tempo con cui le cellule portano a termine il ciclo cellulare. **Ki67** è invece una proteina nucleare presente in due isoforme di 345 e 395 kDa espressa durante tutte le fasi attive del ciclo cellulare (G1, S, G2 e fasi-M), ma assente in cellule resting (G0). L'evidenziazione immunoistochimica di tale proteina (realizzabile attraverso l'impiego di un anticorpo monoclonale denominato MIB-1), permette di riconoscere i mastociti in

effettiva proliferazione e, con opportune tecniche di analisi di immagine, di ottenere il Ki67-index (o frazione di crescita). In diversi studi AgNOR e Ki67-index si sono dimostrati fattori prognostici correlati al grado istologico e utili a discriminare, nell'ambito dei mastocitomi di grado II, i casi a comportamento più aggressivo.

Per il mastocitoma cutaneo del cane è stata valutata, con risultati variabili, l'utilità prognostica di una gran numero di marker immunoistochimici (p53, COX2, vWF-RA, MMP2, MMP9, triptasi, chimasi, ecc), ma l'attenzione è attualmente focalizzata sull'espressione del recettore **KIT (CD117)**, un recettore tirosin-chinasico di tipo III codificato dal proto-oncogene c-kit, composto da un dominio extracellulare per la captazione del ligando, un dominio transmembranario, un dominio juxtamembranario ad attività moderatrice ed un dominio tirosin-chinasico. Nel cane, KIT è normalmente espresso in vari tipi cellulari tra cui i mastociti, cellule germinali, melanociti, cellule di Cajal ed elementi emopoietici. Nei mastociti, il KIT e il suo ligando specifico Stem Cell Factor (SCF o fattore di crescita dei mastociti) sono coinvolti nella sopravvivenza cellulare, proliferazione, differenziazione, chemiotassi, degranulazione e adesione alla fibronectina. Di recente c-kit è stato correlato alla patogenesi del mastocitoma cutaneo canino. E' stato infatti scoperto che in una percentuale di casi variabile dal 15% al 50% sono presenti nelle cellule del mastocitoma canino mutazioni di c-kit, in particolare a carico del tratto che codifica per il dominio juxtamembranario di KIT (esone 11), che possono portare alla produzione di una proteina patologicamente attivata, in grado cioè di indurre l'attivazione del recettore KIT e la trasduzione al nucleo di segnali per la proliferazione cellulare senza l'intervento dello specifico ligando, il che implica c-kit nella patogenesi e nella progressione della neoplasia. Studi recenti hanno inoltre dimostrato un'associazione statisticamente significativa tra mutazioni di c-kit e grado istologico del mastocitoma, e che i cani affetti da mastocitomi con mutazioni hanno prognosi peggiore rispetto a quelli senza mutazioni.

L'evidenziazione immunoistochimica del recettore KIT permette di rilevare nei mastocitomi di cane tre diversi pattern: un'espressione limitata alla membrana citoplasmatica analoga a quella verificabile nei mastociti normali (KIT pattern 1); un'espressione citoplasmatica a spot paranucleari (KIT pattern 2) e un'espressione citoplasmatica diffusa (KIT pattern 3). La patologica localizzazione citoplasmatica di KIT è significativamente associata alla presenza di mutazioni nel gene c-kit, e i mastocitomi che mostrano un'aberrante localizzazione di KIT (pattern 2 o 3) hanno una prognosi decisamente peggiore di quelli con pattern 1. Oltre al significato prognostico, la valutazione dello stato di KIT ha anche interessanti risvolti terapeutici. Nei soggetti in cui le cellule del mastocitoma presentano un KIT alterato (localizzazione aberrante e/o mutazioni di c-kit) è indicata la terapia con inibitori delle tirosin-chinasi. Fra questi nel cane è stato sperimentato con un certo successo soprattutto l'imatinib, una piccola molecola che blocca il sito legante ATP delle chinasi agendo come inibitore competitivo, impedendo la fosforilazione della chinasi e l'attivazione dei segnali a cascata.

Un ulteriore elemento prognostico di competenza istopatologica è la valutazione dell'adeguatezza dei **margini** di escissione chirurgica. È una tecnica concettualmente semplice, anche se piuttosto indaginosa dal punto di vista pratico, che prevede l'esame istologico delle parti periferiche del tessuto rimosso, al fine di giudicare la completezza dell'escissione. Se sui margini del pezzo asportato sono presenti cellule neoplastiche, è certo che altre cellule neoplastiche sono rimaste in situ, e potrà svilupparsi una recidiva. Rispetto alle normali tecniche di fissazione e preparazione di un pezzo istologico, che mirano alla sola formulazione diagnostica, quando è richiesta la marginazione di una neoplasia è necessario fissare tutta la parte asportata e non solo un campione di essa, avendo cura di "marcare" i margini chirurgici con inchiostro di china o altri coloranti appositi, per evitare di confondere un margine chirurgico con un margine creato durante la rifilatura del pezzo, e orientare opportunamente il pezzo. È necessario tenere comunque conto che nel caso del mastocitoma del cane la procedura può non essere completamente attendibile. In alcuni casi, soprattutto in mastocitomi di grado II e III, si può infatti sviluppare la recidiva anche se i margini erano stati giudicati puliti; questo tipo di errore (falso negativo) è attribuibile al fatto che la valutazione istologica dei margini è eseguita a campione, in quanto non è fisicamente possibile osservare tutta la superficie dei margini. Altre volte i margini sono giudicati istologicamente contaminati, ma il successivo follow up non evidenzia alcuna recidiva; questo tipo di errore (falso positivo) è invece attribuito nella maggior parte dei casi alla ubiquitarietà dei mastociti, per cui può essere molto difficile differenziare se isolati mastociti presenti sui margini sono mastociti normali o neoplastici. La procedura di valutazione dei margini è comunque da considerare complessivamente valida, soprattutto quando mette in evidenza margini di escissione molto esigui (inferiori al millimetro), o addirittura la continuità con il tessuto neoplastico.

Feline mast cell tumors

Charyl London DMV, Diplomate ACVIM Oncology

Mast cell neoplasia in the cat occurs in three basic forms: cutaneous MCT, splenic mast cell disease (sometimes referred to as lymphoreticular) and intestinal MCT. The biologic behavior of these diseases is strikingly different, so they will each be considered separately.

1. Cutaneous Feline MCT

Cutaneous MCTs represent the second most commonly encountered cutaneous tumor in the cat¹⁻³. Two forms have been reported: mastocytic MCTs that appear histologically similar to those found in dogs, and histiocytic MCTs, a rare variant known to spontaneously regress that possess features of histiocytic cells⁴. In general, feline cutaneous MCT are solitary, raised, firm, hairless, well-circumscribed dermal nodules between 0.5-3 cm in diameter^{3,5,6}. Occasionally, the surface of the tumor may be ulcerated, and some of the tumors will present as plaque-like lesions. In one report, approximately 20% of the tumors were multiple in nature¹. These tumors are most likely to occur on the head and neck (often involving the pinna near the base of the ear), followed by the trunk and limbs^{3,5,7}. Affected cats usually do not exhibit clinical signs of disease other than pruritus.

As with canine tumors, feline MCTs are usually easily diagnosed by cytologic examination of fine needle aspirates. Cats with cutaneous MCT should be evaluated for evidence of additional tumors, as well as potential splenic involvement as a recent study found that some cats with multiple cutaneous MCTs also had splenic disease⁸. In addition, a minimum data base is recommended, along with careful examination of local lymph nodes for evidence of lymphadenopathy.

With respect to the typical mastocytic variant of feline MCT, they are often categorized as either compact (representing 50-90% of all cases) or diffuse (histologically anaplastic)⁵. Several studies have now demonstrated that well-differentiated compact tumors tend to behave in a benign manner and metastasis is uncommon⁷⁻⁹. In contrast, anaplastic tumors may have a high mitotic index, marked cellular and nuclear

pleomorphism, with infiltration into the subcutaneous tissues⁶. These have been reported to behave in a more malignant manner metastasizing to local lymph nodes, spleen, blood, and bone marrow. However, a more recent study evaluated pleomorphic cutaneous MCTs from 15 cats and found that the majority were behaviorally benign; only 1 cat was euthanized due to disease progression¹⁰. Interestingly, in both studies, tumors with a high mitotic index were most likely to recur or exhibit metastasis, suggesting that this histopathologic feature may be useful for predicting biologic behavior.

The definitive treatment for cutaneous feline MCT is surgical excision. In a series of 32 cats with cutaneous MCT, 5 of these tumors recurred following surgical excision, although none of the cats in this study died of disease. In this study, completeness of excision and histopathologic factors such as nuclear pleomorphism and mitotic index were not associated with tumor recurrence⁹. Other reports have demonstrated local recurrence rates following excision between 0-24%^{5-8,10}. Systemic spread of cutaneous tumors has been reported in 0 to 22% of cases, although those that metastasized may have been anaplastic tumors⁶⁻¹⁰. As previously discussed, those tumors with a high mitotic index are probably more likely to recur post surgery or metastasize to local lymph nodes and/or abdominal organs^{10,11}.

Radiation therapy may be considered for tumors that are incompletely excised. A recent study demonstrated that feline cutaneous MCTs treated with strontium 90 irradiation exhibited a 98% control rate, with median survival times greater than 3 years¹². Limited information exists concerning the utility of chemotherapy in cats with MCT. It is generally believed that feline MCTs are less responsive to prednisone than their canine counterparts. Responses to lomustine (CCNU) have been reported in cats^{13,14}. Of 20 cats with cutaneous MCTs, 10 exhibited complete (n=2) or partial (n=8) response to lomustine¹⁴. Some investigators have utilized a combination of prednisone and chlorambucil to treat metastatic or multiple tumors. This is generally well-tolerated, although its effectiveness is not clear.

2. Splenic (Visceral) MCT

This form of neoplastic mast cell disease is also referred to as visceral or lymphoreticular. It is the most common disease of the spleen of cats, affecting older

animals (mean age 10 years) with no sex or breed predilection^{5,8,15}. While the spleen is the primary site affected by this disease, other organs may also be involved including the liver, mesenteric lymph nodes, bone marrow, lung, intestine^{5,16}. Additionally, circulating mast cells may be found in many cases, and pleural and/or peritoneal effusions may be noted^{5,16}. The majority of cats with splenic MCTs do not have a history of cutaneous MCT although recent evidence suggests that cats with multiple cutaneous MCTs may also have splenic involvement⁸. Cats with splenic MCT often present with signs of systemic illness including vomiting, anorexia, and weight loss^{5,16}. Dyspnea may be evident if pleural effusion is present. Abdominal palpation usually reveals a markedly enlarged spleen and/or liver. Clinical signs associated with the release of mast cell mediators, such as GI ulceration, hemorrhage, hypotensive shock and labored breathing may also be noted.

Cats with suspected splenic MCT should undergo a standard work-up including minimum data base (CBC, chemistry profile, urinalysis) as well as abdominal ultrasound and thoracic radiographs (rule out pleural effusion, anterior mediastinal mass). Unlike with the cutaneous form of MCT in cats and dogs, splenic MCT in the cat is often associated with the presence of circulating mast cells^{5,16}. Furthermore, up to 50% of cats will have evidence of bone marrow infiltration by mast cells^{5,16}. It is important to note that the finding of multi-organ involvement does not necessarily indicate a poorer prognosis. Anemia is also a common hematologic finding, with eosinophilia less likely to be observed^{5,16}. Lastly, in one report of 43 cats with splenic mast cell disease, 90% had an abnormal coagulation profile, although this did not appear to be of clinical significance¹⁶.

Splenectomy is the treatment of choice for cats with splenic MCT, even if other organ involvement is noted. Pre-treatment with H1 and H2 blockers prior to therapy is indicated; intraoperative death may occur due to the release of mast cell mediators. Median survival times of 12-19 months have been reported in cats with splenic MCT and bone marrow/peripheral blood involvement following splenectomy alone¹⁶⁻¹⁸. While the peripheral mastocytosis usually does not completely resolve, it does decline significantly and the cats experience good quality of life for long periods of time. Cats should be followed post-operatively with buffy coat smears, as a rise in the number of mast cells in

the periphery may indicate disease progression. Anorexia, significant weight loss and the male sex were found to be negative prognostic indicators in one study¹⁶. Adjunctive chemotherapy with prednisone, lomustine, and/or chlorambucil has been attempted in a limited number of cases but it is not clear if these therapies are of clinical value. Recently, a cat with splenic mast cell disease and systemic mastocytosis was treated with the Kit inhibitor imatinib and exhibited a significant response to therapy including complete resolution of tumor masses and marked reduction in circulating mast cells¹⁹. Interestingly, this cat's tumor cells expressed a mutation in Kit that may have been responsible for the observed response to imatinib.

3. Feline Intestinal MCT

MCTs represent the third most common intestinal tumor in the cat, with lymphoma and adenocarcinoma the first and second, respectively⁵. Most cats have a history of vomiting, diarrhea and anorexia and a solitary palpable abdominal mass is usually evident on physical examination^{5,20}. As metastasis is common with this disease, enlarged mesenteric lymph nodes and/or hepatomegaly may also be noted. A peritoneal effusion may be present, and this often contains mast cells and eosinophils. Diagnosis may be made by fine needle aspiration of the mass or involved organs. As with splenic MCT, these cats should be staged with a minimum data base (CBC, biochemistry profile, urinalysis), thoracic radiographs and abdominal ultrasound. Buffy coat smear and bone marrow aspiration may also be performed, although unlike splenic MCT, intestinal MCT rarely involves these organs. However, it may be useful to distinguish splenic MCT with intestinal involvement from the distinct syndrome of intestinal MCT.

Surgery is the treatment of choice for intestinal MCT. Wide surgical margins are necessary (5-10 cm) as the tumor often extends histologically well beyond the observable gross disease^{5,20}. The historical survival times of cats with intestinal MCT are poor, as metastasis is common at the time of diagnosis. Limited information regarding the use of chemotherapy in these cases is available, although anecdotal responses to lomustine and chlorambucil have been reported. Recently, 2 cats exhibited objective responses (1 complete, 1 partial) following treatment with lomustine, suggesting that this agent may be useful in cats with intestinal mast cell tumors¹⁴.

References

1. Bostock DE. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *Br Vet J* 1986;142:1-19.
2. Brodey RS. Canine and feline neoplasia. *Adv Vet Sci Comp Med* 1970;14:309-354.
3. Miller MA, Nelson SL, Turk JR, et al. Cutaneous neoplasia in 340 cats. *Vet Pathol* 1991;28:389-395.
4. Chastain CB, Turk MA, O'Brien D. Benign cutaneous mastocytomas in two litters of Siamese kittens. *J Am Vet Med Assoc* 1988;193:959-960.
5. Carpenter JL, Andrews LK, Holzworth J. Tumors and tumor like lesions. In: Holzworth J, ed. *Diseases of the Cat: Medicine and Surgery*. Philadelphia: W. B. Saunders; 1987:406-596.
6. Wilcock BP, Yager JA, Zink MC. The morphology and behavior of feline cutaneous mastocytomas. *Vet Pathol* 1986;23:320-324.
7. Buerger RG, Scott DW. Cutaneous mast cell neoplasia in cats: 14 cases (1975-1985). *J Am Vet Med Assoc* 1987;190:1440-1444.
8. Litster AL, Sorenmo KU. Characterisation of the signalment, clinical and survival characteristics of 41 cats with mast cell neoplasia. *J Feline Med Surg* 2006;8:177-183.
9. Molander-McCrary H, Henry CJ, Potter K, et al. Cutaneous mast cell tumors in cats: 32 cases (1991-1994). *J Am Anim Hosp Assoc* 1998;34:281-284.
10. Johnson TO, Schulman FY, Lipscomb TP, et al. Histopathology and biologic behavior of pleomorphic cutaneous mast cell tumors in fifteen cats. *Vet Pathol* 2002;39:452-457.
11. Lepri E, Ricci G, Leonardi L, et al. Diagnostic and prognostic features of feline cutaneous mast cell tumours: a retrospective analysis of 40 cases. *Vet Res Commun* 2003;27 Suppl 1:707-709.
12. Turrel JM, Farrelly J, Page RL, et al. Evaluation of strontium 90 irradiation in treatment of cutaneous mast cell tumors in cats: 35 cases (1992-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2006;228:898-901.
13. Rassnick KM, Gieger TL, Williams LE, et al. Phase I evaluation of CCNU (lomustine) in tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med* 2001;15:196-199.
14. Rassnick KM, Williams LE, Kristal O, et al. Lomustine for treatment of mast cell tumors in cats: 38 cases (1999-2005). *J Am Vet Med Assoc* 2008;232:1200-1205.
15. Spangler WL, Culbertson MR. Prevalence and type of splenic diseases in cats: 455 cases (1985-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1992;201:773-776.
16. Feinmehl R, Matus R, Maulden GN, et al. Splenic mast cell tumors in 43 cats (1975-1992). *Proc Annu Conf Vet Cancer Soc* 1992;12:50.
17. Guerre R, Millet P, Groulade P. Systemic mastocytosis in a cat: remission after splenectomy. *J Small Anim Pract* 1979;20:769-772.
18. Liska WD, MacEwen EG, Zaki FA, et al. Feline systemic mastocytosis: A review and results of splenectomy in seven cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 1979;15:589-597.
19. Isotani M, Tamura K, Yagihara H, et al. Identification of a c-kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;114:168-

172.

20. Bortnowski HB, Rosenthal RC. Gastrointestinal mast cell tumors and eosinophilia in two cats. J Am Anim Hosp Assoc 1992;28:271-275.

Mastocitoma: controversie

Giorgio Romanelli, DMV, Dipl ECVS
giorgioromanelli@alice.it

Introduzione

La diagnosi ed il trattamento del mastocitoma cutaneo sono fonte di discussione per quello che riguarda alcuni parametri diagnostici e terapeutici

Saranno esaminati

- Margini di escissione
- Resezione completa ed incompleta
- Gradazione e stadiazione
- Fattori prognostici istologici
- Tumore singolo e multiplo
- Sito anatomico d'insorgenza

Di ciascuno sarà indicata la bibliografia essenziale

Stato linfonodale, midollare e del sangue periferico

Il numero di mastociti necessario per considerare un linfonodo metastatico non è chiaro e, la normale presenza di tali cellule nei linfonodi può dare adito a contraddizioni.

Il numero varia dal 3% in totale a “cellule atipiche o in clusters di cellule atipiche senza segni di iperplasia linfoide”

La possibilità di valutare la morfometria sembra essere più precisa, così come potrebbe essere la evidenziazione mediante colorazione KIT di cellule con espressione citoplasmatica

Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors

Anke Langenbach, VMD, DACVS; Patricia M. McManus, VMD, PhD, DACVP;
Mattie J. Hendrick, VMD, DACVP; Frances S. Shofer, PhD; Karin U. Sorenmo, CMV, DACVIM

J Am Vet Med Assoc 2001;218:1424–1428

Determination of the number of mast cells in lymph node, bone marrow, and buffy coat cytologic specimens from dogs.

Bookbinder PF, Butt MT, Harvey HJ.

J Am Vet Med Assoc. 1992 Jun 1;200(11):1648-50.

Morphometrical approach for predicting regional lymph node micrometastatic load in canine mast cell tumours: preliminary results

L. Marconato, V. Marchetti, D. Francione, C. Masserdotti, M. Gregori,

R. Leotta and F. Abramo

Veterinary and Comparative Oncology, 6, 3, 162–170

Buffy Coat

La determinazione del numero di mastocellule nel buffy coat è considerato inattendibile per la valutazione di mastocitosi, vista la possibilità che il numero sia maggiore in caso di malattie diversa dal mastocitoma cutaneo

Determination of the number of mast cells in lymph node, bone marrow, and buffy coat cytologic specimens from dogs.

Bookbinder PF, Butt MT, Harvey HJ.

J Am Vet Med Assoc. 1992 Jun 1;200(11):1648-50.

Evaluation of buffy coat smears for circulating mast cells in healthy cats and ill cats without mast cell tumor-related disease.

Garrett LD, Craig CL, Szladovits B, Chun R.

J Am Vet Med Assoc. 2007 Dec 1;231(11):1685-7.

Frequency and severity of mastocytemia in dogs with and without mast cell tumors: 120 cases (1995-1997).

McManus PM.

J Am Vet Med Assoc. 1999 Aug 1;215(3):355-7.

Midollo

Anche in questo caso, il numero di mastociti che devono essere rilevati per considerarlo invasivo non è chiaro e comune a tutti gli autori ed è variabile dal 3 al 10% delle cellule nucleate midollari

Systemic mastocytosis in 16 dogs.

O'Keefe DA, Couto CG, Burke-Schwartz C, Jacobs RM.

J Vet Intern Med. 1987 Apr-Jun;1(2):75-80.

Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and

prednisone: 35 cases (1997 – 2004)

M. A . Camps-Palau 1 , N. F . Leibman 2 , R. Elmslie 3 , S. E . Lana 4 , S. Plaza 4 ,
J. A . McKnight 2 , R. Risbon 5 and P. J . Bergman 2

Veterinary and Comparative Oncology, 5, 3 , 156 – 167

Clinicopathological Features and Outcome for Dogs with Mast Cell Tumors and Bone Marrow Involvement

L. Marconato, G. Bettini, C. Giacoboni, G. Romanelli, A. Cesari, A. Zatelli, and E. Zini
J Vet Intern Med 2008;22:1001–1007

Margini di exeresi e completezza di escissione

Tradizionalmente il “gold standard” è stato considerato 3 cm ma 2 cm di margine con un piano fasciale sul margine profondo sono sufficienti nella maggior parte dei mastocitomi di 1° e 2°.

Probabilmente non c'è un reale margine nei mastocitomi di 3°

Riguardo la completezza di escissione il lavoro di Michels et al, esamina la prognosi di pazienti con neoplasia asportata e non asportata in maniera completa. Anche se la differenza non è statisticamente significativa, esaminando i singoli dati, si evidenzia che la sopravvivenza media di pazienti con margini completi o incompleti è, rispettivamente, di 53,5 e 15 mesi

Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs

Ryan P. Fulcher, DVM; Lori L. Ludwig, VMD, MS, DACVS; Philip J. Bergman, DVM, PhD, DACVIM;

Shelley J. Newman, DVM, DVSc, DACVP; Amelia M. Simpson, DVM, DACVS; Amiya K. Patnaik, DVM, MS†

J Am Vet Med Assoc, Vol 228, No. 2, January 15, 2006

Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs

Amelia M. Simpson, DVM; Lori L. Ludwig, VMD, MS, DACVS; Shelley J. Newman, DVM, DVSc, DACVP, Philip J. Bergman, DVM, PhD, DACVIM; Heidi A. Hottinger, DVM, DACVS; Amiya K. Patnaik, DVM, MS

J Am Vet Med Assoc Vol 224, No. 2, January 15, 2004

Prognosis Following Surgical Excision of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors With Histopathologically Tumor-Free Versus Nontumor-Free Margins: A Retrospective Study of 31 Cases

Gina M. Michels, DVM, MS Diplomate ACVCP, Deborah W. Knapp, DVM, MS, Diplomate ACVIM, Dennis B. DeNicola, DVM, PhD Diplomate ACVP, Nita Glickman,

PhD and Patty Bonney, RVT
JAAHA, September/October 2002, Vol. 38

Recurrence Rate, Clinical Outcome, and Cellular Proliferation Indices as Prognostic Indicators after Incomplete Surgical Excision of Cutaneous Grade II Mast Cell Tumors: 28 Dogs (1994–2002)

Bernard Seguin, M. Faulkner Besancon, Jennifer L. McCallan, Lorelei L. Dewe, Matthew C. Tenwolde, Emily K. Wong, and Michael S. Kent
J Vet Intern Med 2006;20:933–940

Gradazione e stadiazione

La gradazione di Patnaik è applicabile solo ai tumori cutanei. Buona parte dei tumori di 2° e 3° automaticamente dovrebbero essere compresi nello stadio 3. Inoltre in uno studio solo. Inoltre in un lavoro in cui 60 mastocitomi erano stati esaminati da 10 patologi diversi, in soli 4 casi tutti erano d'accordo sul grado

Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors
Nicole C. Northrup¹, Barry G. Harmon, Tracy L. Gieger, Cathy A. Brown, K. Paige Carmichael, Anapatriicia Garcia, Kenneth S. Latimer, John S. Munday, Pauline M. Rakich, Lauren J. Richey, Nancy L. Stedman, An-Lin Cheng, Elizabeth W. Howerth
J Vet Diagn Invest 17:245–248 (2005)

Fattori prognostici istologici

Sono stati esaminati il numero di AgNORs, la PCNA, il Ki-67, l'indice mitotico e l'analisi morfometrica della neoplasia.

Di questi solo il Ki-67 si è dimostrato associato alla prognosi e indipendente dal grado istologico

Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication

J. D. Webster, V. Yuzbasiyan-Gurkan, R. A. Miller, J. B. Kaneene, And M. Kiupel
Vet Pathol 44:298–308 (2007)

Expression of c-kit proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction

Lauretta Turin,¹ Fabio Acocella, Damiano Stefanello, Angelo Oseliero, Danilo Fondrini, Stefano Brizzola, Federica Riva
J Vet Diagn Invest 18:343–349 (2006)

Mitotic Index Is Predictive for Survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors
E. M. Romansik, C. M. Reilly, P. H. Kass, P. F. Moore, And C. A. London
Vet Pathol 44:335–341 (2007)

Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog
Rosario Preziosi¹, Maria Morini, Giuseppe Sarli
J Vet Diagn Invest 16:554–561 (2004)

Canine Mast Cell Tumors: Correlation of Apoptosis and Proliferation Markers with Prognosis
Timothy J. Scase, David Edwards, Jodi Miller, William Henley, Ken Smith, Anthony Blunden, and Sue Murphy
J Vet Intern Med 2006;20:151–158

Recurrence Rate, Clinical Outcome, and Cellular Proliferation Indices as Prognostic Indicators after Incomplete Surgical Excision of Cutaneous Grade II Mast Cell Tumors: 28 Dogs (1994–2002)
Bernard Seguin, M. Faulkner Besancon, Jennifer L. McCallan, Lorelei L. Dewe, Matthew C. Tenwolde, Emily K. Wong, and Michael S. Kent
J Vet Intern Med 2006;20:933–940

Morphometry of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors
R. De F. Strefezzi, J. G. Xavier, And J. L. Cata~ O-Dias
Vet Pathol 40:268–275 (2003)

Tumore singolo o multiplo

In pazienti con neoplasie multiple (da 2 a 6) la prognosi è simile a pazienti con singola neoplasia

Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004)
Marie N. Mullins, DVM, MS, DACVIM; William S. Dernell, DVM, MS, DACVS; Stephen J. Withrow, DVM, DACVS, DACVIM; Eugene J. Ehrhart, DVM, PhD, DACVP; Douglas H. Thamm, VMD, DACVIM; Susan E. Lana, DVM, MS, DACVIM
J Am Vet Med Assoc., Vol 228, No. 1, January 1, 2006

Sito anatomico d'insorgenza

Tradizionalmente i mastocitomi che insorgono in zona inguinale, prepuziale scrotale e perineale sono considerati avere prognosi peggiore. Alcuni lavori recenti confutano

questa tesi anche se la lettura attenta e la divisione in sottogruppi, rileva ancora alcune differenze sostanziali.

Mastocitomi della pinna e del muso sembrano avere prognosi peggiore

Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990–2001)

Gabriella Sfiligoi, DVM; Kenneth M. Rassnick, DVM, DACVIM; Janet M. Scarlett, DVM, PhD; Nicole C. Northrup, DVM, DACVIM; Tracy L. Gieger, DVM, DACVIM
J Am Vet Med Assoc., Vol 226, No. 8, April 15, 2005

Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994–2002)

Alane Kosanovich Cahalane, DVM, MA; Sarah Payne, DVM; Lisa G. Barber, DVM, DACVIM; Lillian E. Duda, VMD, DACVR; Carolyn J. Henry, DVM, MS, DACVIM; Glenna E. Mauldin, DVM, MS, DACVIM; Angela E. Frimberger, VMD, DACVIM; Susan M. Cotter, DVM, DACVIM; Antony S. Moore, MVSc, DACVIM
J Am Vet Med Assoc., Vol 225, No. 3, August 1, 2004

Biologic Behavior and Prognostic Factors for Mast Cell Tumors of the Canine Muzzle: 24 Cases (1990–2001)

Tracy L. Gieger, Alain P. The´on, Jonathan A. Werner, Margaret C. McEntee, Kenneth M. Rassnick, and Hilde E.V. DeCock
J Vet Intern Med 2003;17:687–692

Mastocitoma: terapia chirurgica

Damiano Stefanello DVM, PhD

damiano.stefanello@unimi.it

La terapia chirurgica nel trattamento del mastocitoma canino e felino è sicuramente l'opzione terapeutica più conosciuta e più utilizzata nella pratica clinica ma non sempre il mero atto chirurgico viene inquadrato in un algoritmo decisionale oncologico corretto, conducendo ad errori che, se non preventivati e calcolati, possono essere considerati “*mal practice*”.

La chirurgia ha da sempre un ruolo centrale nel trattamento delle neoplasie unicentriche e il suo intento curativo si lega indissolubilmente con una corretta e completa asportazione della neoplasia che a sua volta è fortemente influenzata dall'esperienza del chirurgo. Relativamente all'esperienza del chirurgo, in diversi articoli di respiro internazionale è accertata nel caso del mastocitoma cutaneo canino e non solo, una contrazione del tempo di sopravvivenza per quei casi non operati in centri di riferimento. È chiaro che una simile affermazione necessita di una opportuna rilettura che deve esplicitare che il risultato clinico non dipende solo dalle capacità tecniche del chirurgo, comunque importanti soprattutto in alcune sedi anatomiche, ma dalla corretta gestione di una eventuale asportazione chirurgica incompleta.

Dato che è ampiamente dimostrato che alla prima chirurgia sono associate le migliori chance di cura, è indispensabile che il chirurgo, per essere nella condizione di eseguire il miglior trattamento possibile, si interroghi su queste domande: 1) Qual è il tipo, lo stadio e il grado del tumore da asportare?; 2) Quali ricadute locali e sistemiche sono associate al tipo, allo stadio e al grado?; 3) Se la cura è possibile, quali sono i risultati cosmetici e funzionali ad essa legati?; 4) L'exeresi è il trattamento di prima scelta?; 5) Quali sono i trattamenti complementari o alternativi alla chirurgia?

Diversi sono i fattori prognostici che possono condizionare la percentuale di recidiva locale, l'intervallo libero da malattia o il tempo di sopravvivenza e ovviamente non sempre questi fattori sono in grado di orientare le scelte cliniche in modo univoco. Tuttavia è doveroso sottolineare che pazienti classificati nello stadio IV (WHO 1980), quindi con metastasi a distanza, hanno tempi di sopravvivenza limitati ed essendo la malattia non più unicentrica, il ruolo della chirurgia è secondario se non inutile e deve

lasciare spazio a terapie sistemiche. Pertanto, una corretta stadiazione clinica prechirurgica consente di escludere dalla chirurgia pazienti che pur non presentando segni clinici sistemici hanno una malattia metastatica. Per questo motivo una valutazione citologica degli organi bersaglio è sempre auspicabile.

Il mastocitoma è un tumore che oltre ad essere distinto per grado, stadio, ed espressione recettoriale si distingue anche per la localizzazione anatomica.

La forma cutanea è considerata decisamente più comune di quelle primariamente viscerali o extracutanee a cui si associa spesso una diffusione metastatica a distanza. La forma cutanea è generalmente unicentrica ma sia nel cane che nel gatto sono presenti mastocitomi cutanei multipli rispettivamente nel 9-14% e nel 20% dei casi.

Le forme primariamente viscerali o extracutanee (milza, fegato, intestino, uretere, cavità nasali ecc..) essendo meno comuni e con comportamento biologico più aggressivo non saranno trattati nello specifico ma si ricorda che ove possibile (sede, stadio) la chirurgia deve essere sempre presa in considerazione.

Le linee guida del trattamento chirurgico del mastocitoma cutaneo prevedono un'exeresi radicale o ad ampi margini, con margini laterali di 3 cm di tessuto sano e con margine profondo rappresentato dal piano fasciale, generalmente identificato in una barriera anatomica nei confronti dell'invasione neoplastica (fasce muscolari, muscoli, tendini, sierose ecc). In due differenti studi è stato riportato che i mastocitomi di I° e II° grado istologico risultano completamente escissi utilizzando 2 cm di tessuto sano lateralmente mentre il rispetto del margine profondo deve sempre comprendere una barriera anatomica (fascia, muscolo, osso). Tuttavia il rispetto dei 3 centimetri se applicabili in considerazione di dimensione e sede, dà maggiori garanzie ed è sempre auspicabile. Infatti non va dimenticato che una chirurgia più conservativa priva della stima dei fattori prognostici potrebbe tradursi in possibili margini infiltrati che costringono a terapie adiuvanti come re-escissione, chemioterapia elettrochemioterapia e radioterapia che, oltre ad non essere scevri da rischi, si traducono in un aumento dei costi di gestione per il proprietario. Inoltre la corrispondenza tra qualità dei margini e recidiva locale non è ad oggi ancora conosciuta, così come l'influenza dei margini sui tempi di sopravvivenza. E' invece dimostrato che la recidiva locale riduce i tempi di sopravvivenza. Sulla base di queste considerazioni si suggerisce quindi di valutare con molta attenzione la riduzione

dell'ampiezza dei margini laterali soprattutto quando il rispetto dei canonici tre centimetri non è condizionato da dimensioni e sede. Infatti diversi studi confermano che la chirurgia eseguita ad ampi margini per mastocitomi di primo e secondo grado a stadio 0 e I (WHO Owen 1980) può essere considerata curativa.

L'obiettivo di una chirurgia che si traduca in margini indenni, con intento curativo deve essere sempre perseguito dal chirurgo in oncologia. Infatti alcune sedi come quella del tronco, del collo, della testa (esclusa la porzione più rostrale) e degli arti sopra il ginocchio e sopra il gomito, quasi sempre consentono chirurgie ad ampi margini. Qualora fossero necessarie chirurgie aggressive seguite da tecniche ricostruttive di notevole difficoltà, la chirurgia ad ampi margini o radicale non deve essere condizionata dalle abilità chirurgiche e deve essere esclusa solo dopo attenta valutazione del singolo caso.

Nel trattamento del mastocitoma cutaneo, la scelta di una chirurgia marginale deve essere applicata con criterio e soprattutto prima di eseguirla bisogna valutare in modo comparativo l'efficacia di altre terapie non chirurgiche (radioterapia vs chemioterapia) neoadiuvanti che possano assicurare una successiva chirurgia con intento curativo. Quando le dimensioni e/o la sede fanno classificare l'atteggiamento chirurgico come citoreducente e/o palliativo è sempre opportuno preparare il proprietario all'eventuale ricorso a terapie adiuvanti quali radioterapia e chemioterapia.

Al fine di una corretta pianificazione della chirurgia non è da escludere, per casi selezionati, la possibilità di avvalersi di studi di diagnostica per immagini come tomografia computerizzata a raggi X e risonanza magnetica.

Il coinvolgimento metastatico del linfonodo regionale da parte del mastocitoma cutaneo è un'evenienza possibile e solitamente associata ad una prognosi infausta, anche se recentemente l'impiego della chemioterapia e della radioterapia sul linfonodo regionale sembrano essere in grado di allungare i tempi di sopravvivenza. Poco offre invece la letteratura circa il ruolo terapeutico della linfadenectomia in presenza di metastasi accertate e non. La linfadenectomia deve essere sempre eseguita, sia in presenza di un linfonodo diagnosticato come metastatico sia in tutti i casi in cui sia aumentato di volume e la citologia non sia stata in grado di fornire una diagnosi di malattia metastatica. Inoltre la linfadenectomia dovrebbe essere eseguita anche in assenza di una linfadenopatia clinicamente evidenziabile in quanto consente con il successivo esame istopatologico di

eseguire una stadiazione e individuare metastasi occulte

L'approccio chirurgico ai mastocitomi multipli non si differenzia da quelli unicentrici e l'exeresi ad ampi margini si è dimostrata un efficace strumento terapeutico. L'incidenza di metastasi a distanza sembra non differire da quelli singoli ma è sempre richiesta comunque un'accurata stadiazione. Tuttavia la possibilità di asportare contemporaneamente tutti i mastocitomi multipli oltre a dipendere dall'esito della ricerca di metastasi a distanza, deve tenere conto delle dimensioni e del numero di mastocitomi. Non esistono precise linee guide a tal proposito ma in una recente ricerca si suggeriva di escludere dal trattamento chirurgico cani con più di 6 mastocitomi per optare su terapie alternative quali la chemioterapia. E' sottinteso che tutti i mastocitomi asportati contemporaneamente devono essere sottoposti ad esame istopatologico per la determinazione del grado e la valutazione dei margini.

Al termine dell'exeresi chirurgica il chirurgo deve preparare la massa escissa per l'invio al patologo al quale verrà richiesta la determinazione del grado istologico e la valutazione dei margini di escissione e se necessario la determinazione dell'espressione della proteina KIT. È quindi necessario inviare tutta la massa escissa e orientare i margini in modo che sia possibile localizzare sul paziente il/ i margine infiltrato/i. Per una corretta e maggiore interazione con il patologo è altresì indispensabile allegare un report completo. Per quanto non siano state identificate correlazioni tra stato dei margini, percentuali di recidiva, tempo di sopravvivenza e intervallo libero da malattia, dalla valutazione dei margini dipenderanno le scelte terapeutiche che il clinico dovrà affrontare nel periodo postoperatorio per cui il loro esame deve essere sempre richiesto ed eseguito.

L'intento curativo della chirurgia nei mastocitomi di I e II stadio non è in discussione così come la necessità di aumentare la probabilità di cura sempre mediante la terapia escissionale ad ampi margini per mastocitomi recidivati con o senza metastasi ai linfonodi regionali. In questo senso la chirurgia può e deve meritare un ruolo anche in mastocitomi di stadio 0 (escluso il grado III per il quale si consiglia sempre la chemioterapia adiuvante) quando possibile. Infatti l'utilizzo della re-escissione come terapia adiuvante ha di recente trovato riscontro in bibliografia per i sarcomi dei tessuti molli, ma il suo impiego è da tempo caldeggiato anche per i mastocitomi cutanei. Questa opzione deve comunque prevedere una chirurgia ad ampio margine sia lateralmente che

in profondità pertanto la sua applicabilità dipende ancora una volta dalla sede e dalle dimensioni della cicatrice. Infine la porzione asportata deve sempre essere sottoposta nuovamente al patologo per l'esame istopatologico con particolare riferimento alla valutazione dei margini.

La chirurgia rappresenta una valida opzione terapeutica per il mastocitoma cutaneo, purchè sia eseguita correttamente e non sia affiancata da una gestione oncologica preoperatoria e postoperatoria incompleta e superficiale .

Mastocitomi e radioterapia

*Barbara Kaser-Hotz DVM, Dipl ACVR Radiology and Radiation Oncology, Dipl ECVDI
e Chiara Leo DMV*

Nonostante la radioterapia sia considerata un metodica relativamente nuova per il trattamento del cancro, essa affonda le sue radici alla fine dell'800, pochi anni dopo la scoperta dei raggi X da parte di Roentgen. Negli ultimi anni le macchine per la radioterapia ed i protocolli terapeutici si sono incredibilmente affinati sia in medicina umana che in medicina veterinaria ed oggi la radioterapia è considerata una delle opzioni cardine per la cura o la palliazione dei tumori.

La radioterapia trova le sue maggiori indicazioni in medicina veterinaria nel trattamento di tumori locali (nonostante in oncologia umana giochi un ruolo fondamentale anche nel trattamento di malattie sistemiche), tra cui i mastocitomi.

Il mastocitoma può essere un rebus complicato da risolvere per l'oncologo veterinario: non solo quasi non esiste un corrispettivo in umana a cui fare riferimento, ma la estrema eterogeneità e variabilità di ciascun mastocitoma obbliga gli oncologi a sartorializzare le terapie su ciascun caso specifico.

La radioterapia può aiutare il trattamento di mastocitomi, sia in maniera curativa che palliativa, la dove la chirurgia non può arrivare da sola collaborando con essa o sostituendosi ad essa completamente.

Nel 1988 uscì il primo articolo¹ che dimostrava l'efficacia della Rt nei mastocitomi con una sopravvivenza media ad 1 anno dell'80% dei cani e a due anni dell'77%. In seguito fu valutata la risposta dei MCTs incompletamente escissi rispetto alla malattia macroscopica: 70 mesi di sopravvivenza con trattamento multimodale (chirurgia + radioterapia) rispetto ai 32 mesi di sola radioterapia².

Vari studi si sono succeduti negli anni e tutti hanno confermato una buona risposta locale dei MCTs ben o moderatamente differenziati alla radioterapia, consolidando la convinzione che il suo utilizzo, specialmente in regimi multimodali, può aumentare considerevolmente le chances di sopravvivenza^{1,2,3,4,5,6,7}

Il vero problema si pone quindi per quei MCTs di grado III, anaplastici, per quelli con presenza di metastasi ai linfonodi tributari o con altri fattori prognostici negativi.

Per i primi, il controllo locale può essere ottenuto con trattamento radioterapico con controllo locale del tumore compreso tra 20 e 27 mesi, ma con un'alta percentuale di recidiva locale o metastasi ai linfonodi se non associata a chemioterapia adiuvante³.

Per i MCTs di grado II con linfonodi positivi per metastasi, se irradiati comprendendo il linfonodo colpito, la sopravvivenza si stabilisce su valori simili a quelli senza metastasi evidenti⁴.

I protocolli di radioterapia che vengono quindi proposti sono di solito curativi (da 48 a 57 Gy somministrati) data la buona risposta e le possibilità di successo. Tali protocolli si svolgono solitamente nell'arco di 3-4 settimane, con frequenza di trattamento di circa 4 sedute a settimana. Durante questo periodo gli animali vengono di solito ospedalizzati. Naturalmente questo non vale per quegli animali che mostrano importanti fattori prognostici negativi, in cui invece viene offerto un trattamento palliativo che consiste in una dose totale minore ma frazionata in dosi singole maggiori per periodi più brevi di tempo.

A lungo è stato dibattuto sull'opportunità di irradiare preventivamente i linfonodi regionali anche in assenza di metastasi visibili. Uno studio⁵ del 2002 sostiene che probabilmente questo non cambia la prognosi e che la percentuale di recidiva o metastasi a distanza rimane invariato. Nell'esperienza dell'autore l'irradiazione profilattica probabilmente migliora la prognosi e quindi viene offerto a tutti quei pazienti che presentano mastocitomi poco differenziati o comparsi in zone considerate a rischio. Il trattamento radioterapico non è completamente scevro da effetti collaterali: essendo una terapia locale gli effetti sono anch'essi locali: dermatiti o mucositi (es. Mastocitomi della bocca, perineo, vulva..) che si verificano con maggior probabilità a seguito di protocolli curativi. Il trattamento consiste di solito nella somministrazione di antinfiammatori (steroidi o non) e nell'impedire all'animale il leccamento o grattamento della parte. Di solito il problema si risolve nell'arco di 1 o 2 settimane.

BIBLIOGRAFIA:

- 1 Turrel JM, Kitchell BE, Miller LM, Théon A: Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs; J Am Vet Med Assoc. 1988 Oct 15;193(8):936-40

- 2 LaDue T, Price GS, Dodge R, Page RL, Thrall DE: Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumors; Vet Radiol Ultrasound. 1998 Jan-Feb;39(1):57-62
- 3 Frimberger AE, Moore AS, LaRue SM, Gliatto JM, Bengtson AE: Radiotherapy of incompletely resected, moderately differentiated mast cell tumors in the dog: 37 cases (1989-1993); J Am Anim Hosp Assoc. 1997 Jul-Aug;33(4):320-4
- 4 Poirier VJ, Adams WM, Forrest LJ, Green EM, Dubielzig RR, Vail DM: Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors; J Am Anim Hosp Assoc. 2006 Nov-Dec;42(6):430-4
- 5 Chaffin K, Thrall DE: Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis; Vet Radiol Ultrasound. 2002 Jul-Aug;43(4):392-5
- 6 Thamm DH, Turek MM, Vail DM: Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases; J Vet Med Sci. 2006 Jun;68(6):581-7
- 7 al-Sarraf R, Mauldin GN, Patnaik AK, Meleo KA: A prospective study of radiation therapy for the treatment of grade 2 mast cell tumors in 32 dogs; J Vet Intern Med. 1996 Nov-Dec;10(6):376-8

Chemotherapy for Mast Cell Tumors

Charyl London DMV, Diplomate ACVIM Oncology

The use of adjuvant chemotherapy is indicated following excision of Grade 3 MCTs, metastatic MCTs, non-resectable high grade tumors, or for any other MCT with negative prognostic indices. While radiation therapy is the treatment of choice for incompletely excised Grade 1 and 2 MCTs, data indicate that post-op chemotherapy may prevent local recurrence and therefore should be considered for patients who are not candidates for radiation, if such therapy is not available or if the owners cannot afford the cost therapy.

1. Corticosteroids:

The reported response rate of canine MCT to prednisone is 20-70%, although the study demonstrating the highest response rate was of short duration (median 10 days) precluding assessment of response durability^{1,2}. Partial remissions are more common than complete remissions, and at least some of the observed response may be due to a decrease in tumor-associated edema secondary to stabilization of mast cell granules and a reduction in mast cell mediator production. Prednisone (or prednisolone) is generally used in all MCT chemotherapy protocols. Doses range from 0.5-2 mg/kg per day, although most dogs are maintained on 0.5 mg/kg every other day for long term treatment.

2. CCNU (lomustine):

In one study, 8/19 dogs (42%) with measurable MCTs had an objective response (1 CR, 7 PR) to single agent lomustine for a median duration of 77 days³. Preliminary unpublished data presented in several abstracts at the Annual Veterinary Cancer Society Meetings over the past 3 years suggests that CCNU given in the adjuvant setting post surgery (either alone or with prednisone and vinblastine) can significantly prolong survival times of dogs with high grade tumors or tumors with negative prognostic indicators. CCNU can induce hematopoietic and hepatic toxicity including severe neutropenia, thrombocytopenia and liver failure. Patients receiving this drug should be monitored very closely and the CCNU should be discontinued if there is evidence of either toxicity. In general, CCNU is dosed at 50-70 mg/m² orally every 3-4 weeks. A CBC and liver panel should be performed prior to each dose. CCNU is often given in an alternating manner with vinblastine.

3. Vinca Alkaloids:

Single agent response rates of vincristine, vinblastine and vinorelbine are 7%, 12% and 13%, respectively, suggesting that vinca alkaloids are not effective as sole agents for the treatment of MCTs⁴⁻⁶. Vinblastine has been combined with prednisone in other studies, inducing objective responses ranging from 27-47%^{7,8}. A combination of vinblastine, cyclophosphamide and prednisone resulted in a 64% (7/11) response rate in 1 study⁹. Lastly, adjuvant vinblastine and prednisone therapy was used to treat dogs with Grade 3 MCTs that had undergone surgical excision resulting in survival times. During a median follow-up period of 429 days, the overall median survival time was not reached¹⁰.

However, dogs presenting with lymph node metastasis prior to tumor removal had a shorter median survival time of 322 days. Given the single agent prednisone response rate, it is not clear how much the vinblastine contributed to the observed responses in these studies. The dose of vinblastine is 2-3 mg/m² given every 1-3 weeks. The major toxicity of this drug is neutropenia (approximately 5-6% of patients experience this) and occasional gastrointestinal upset is noted. This drug is a vesicant and thus must be given through intravenous injection. It is often used in an alternating manner with CCNU.

4. Miscellaneous agents:

Several other chemotherapeutic agents have been tested against MCTs in dogs without much success, including doxorubicin, asparaginase, and cytosine arabinoside, amongst others. The alkylating agent Leukeran (chlorambucil) is often used as a substitute for CCNU should hepatotoxicity develop. However, there are no published reports on the efficacy of this drug. The typical dose is 20-40 mg/m² given once every 2 weeks. Recently, the use of a modified of paclitaxel was reported in dogs. In a Phase I/II clinical trial of a micellar form of nano-particular water-soluble cremephor-free paclitaxel, an overall 67% response rate was noted in a variety of tumors (reported at the 30th Annual Veterinary Cancer Society Meeting, 2007). The highest response rate was seen in MCTs. This suggests that paclitaxel and its derivatives are likely to have activity against canine MCTs. A Phase III study of this drug in MCTs is ongoing. Lastly, a clinical trial evaluating the potential utility of a novel immune modulator LDI-100 (a preparation containing human chorionic gonadotropin and bacillus Calmette-Guerin) was performed in dogs with MCTs⁵. This agent induced a 28% overall response rate in treated patients, suggesting that some MCTs may respond to immunotherapy.

References

1. McCaw DL, Miller MA, Ogilvie GK, et al. Response of canine mast cell tumors to treatment with oral prednisone. *J Vet Intern Med* 1994;8:406-408.
2. Stanclift RM, Gilson SD. Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2008;232:53-62.
3. Rassnick KM, Moore AS, Williams LE, et al. Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (lomustine). *J Vet Intern Med* 1999;13:601-605.
4. Grant IA, Rodriguez CO, Kent MS, et al. A Phase II Clinical Trial of Vinorelbine in Dogs with Cutaneous Mast Cell Tumors. *J Vet Intern Med* 2008.
5. Henry CJ, Downing S, Rosenthal RC, et al. Evaluation of a novel immunomodulator composed of human chorionic gonadotropin and bacillus Calmette-Guerin for treatment of canine mast cell tumors in clinically affected dogs. *Am J Vet Res* 2007;68:1246-1251.
6. McCaw DL, Miller MA, Bergman PJ, et al. Vincristine therapy for mast cell tumors in dogs. *J Vet Intern Med* 1997;11:375-378.
7. Thamm DH, Mauldin EA, Vail DM. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor--41 cases (1992-1997). *J Vet Intern Med* 1999;13:491-497.
8. Thamm DH, Turek MM, Vail DM. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *J Vet Med Sci* 2006;68:581-587.
9. Camps-Palau MA, Leibman NF, Elmslie R, et al. Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004). *Vet Comp Onc* 2007;5:156-167.
10. Hayes A, Adams V, Smith K, et al. Vinblastine and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Comp Onc* 2007;5:168-176.

Molecular Targeted Therapy

Charyl London DMV, Diplomate ACVIM Oncology

Advances in molecular techniques have provided important new insights into the biology of cancer. Perhaps most relevant has been the finding that cellular components that regulate signal transduction, cell survival, and cell proliferation are dysregulated in cancer cells. In many instances, cancer cells become dependent on these abnormal pathways and as such, they have arisen as promising targets for therapeutic intervention. A variety of small molecule inhibitors that target specific cellular proteins have now been approved for the treatment of human cancer, and it is likely many more will become available in the near future. While the application of targeted therapeutics is relatively new in veterinary medicine, it has been most intensively investigated in mast cell tumors, resulting in the identification of new approaches to treat this disease.

1. Kit Dysfunction in Mast Cell tumors

Kit is a receptor found on mast cells (as well as hematopoietic stem cells and melanocytes, among others) and Kit signaling is required for the differentiation, survival, and function of mast cells¹⁻⁷. Mutations in Kit have been demonstrated to occur in systemic mastocytosis in people and these mutations lead to excessive signaling, resulting in loss of growth control⁸⁻¹⁴. Several authors have identified the presence of Kit mutations in dog mast cell tumors (MCTs) and these also result in uncontrolled signaling¹⁵⁻¹⁸. In the majority of affected dogs, the Kit mutations consist of internal tandem duplications (ITDs) in the juxtamembrane domain of Kit (encoded by exons 11-12). This region of Kit is responsible for negatively regulating receptor activation and evidence suggests that the ITDs disrupt the structure of this domain, resulting in a loss of this function¹⁹. Up to 30% of all dog MCTs may carry Kit mutations and these have been shown to be significantly associated with tumor grade: mutations are rarely identified in well-differentiated tumors while approximately 35% of poorly differentiated tumors carry an ITD^{18,20}. Furthermore, the mutations have been associated with local recurrence and decreased survival. The Kit mutations are not germ-line in nature (i.e., are not inherited) and therefore are not responsible for the observed breed predispositions

to the development of MCTs. However, they do represent a target for therapy.

2. Inhibitors of Kit

While several strategies exist for targeting protein kinases such as Kit, the most successful approach to date has been the use of small molecule inhibitors. These typically work by blocking the ATP binding site of kinases, essentially acting as competitive inhibitors²¹⁻²³. In the absence of ATP binding, the kinase is not able to phosphorylate itself or initiate downstream signaling. Such inhibitors are often easy to synthesize in large quantities, frequently orally bioavailable, and can readily enter cells to gain access to the intended target. Perhaps the most successful small molecule kinase inhibitor developed to date is Gleevec (STI571, imatinib mesylate, Novartis) an orally administered drug that blocks the activity of Kit in addition to other targets such as Abl and PDGFR. Gleevec has been used to treat canine MCTs based on the notion that as Kit dysregulation is common, inhibiting Kit will result in death of malignant mast cells, especially in those cases possessing a Kit mutation. A recent study demonstrated some response to therapy in 10/21 dogs treated with Gleevec; the objective response rate was 100% in dogs whose MCTs possessed a Kit ITD²⁴. Another study reported partial responses to therapy in 3 dogs with systemic mast cell disease treated with imatinib²⁵. However, it is important to note that imatinib can cause severe idiosyncratic hepatotoxicity and is extremely expensive, thereby limiting its use on a widespread basis.

Given the issues with Gleevec, effort has been directed at identifying alternative small molecule Kit inhibitors that could be used in dogs. SU11654 [Palladia] and AB1010 [Kinavet] are two orally bioavailable Kit inhibitors that have recently been demonstrated to have activity against canine MCTs²⁶. In a placebo controlled randomized study, the response rate in Palladia-treated dogs was 37.2% versus 7.9% in placebo-treated dogs²⁷. Of 58 dogs that received Palladia following placebo escape, 41.4% experienced an objective response and the overall response rate for all dogs in this study receiving Palladia was 42.8%. This single agent response rate is similar to that noted with either single agent lomustine or combinations of vinblastine and prednisone. Recently, an open label phase II study of a specific Kit inhibitor AB1010 (AB Science) was completed in dogs with grade II and III MCTs. Of 13 dogs treated, there were 2 complete responses, 2

partial responses, and stable diseases in additional 2 dogs; the drug was well tolerated (Axiak et al, VCS 2006, personal communication). A randomized double blind placebo controlled phase III study of AB1010 was completed and although there was not a significant difference in response rates between the placebo and AB1010 treated dogs, there was a significant difference in time to progression between the two groups, suggesting that AB1010 has biologic activity in MCTs.

While Gleevec may induce hepatotoxicity in dogs, it is apparently well tolerated in cats. A Phase I clinical trial evaluating the toxicity of Gleevec was performed in 9 cats with a variety of tumors²⁸. Doses of 10-15 mg/kg were well tolerated with no evidence of hematologic toxicity and only mild gastrointestinal toxicity. Recently, a cat with systemic mastocytosis was treated with Gleevec at a dose of 10 mg/kg²⁹. The cat exhibited a complete response to therapy at 5 weeks of treatment with no obvious toxicity. Interestingly, the malignant mast cells possessed a mutation in exon 8 of Kit (extracellular ligand binding domain). Mutations in this region of Kit have been described in human AML and are known to constitutive activation of Kit in the absence of ligand binding. Therefore, it is possible that in this instance the cat's mast cell disease was driven by Kit dysregulation, thus supporting the notion that inhibition of Kit signaling was responsible for the observed response to therapy.

3. Heat Shock Protein 90 Inhibitors

Heat shock protein 90 (HSP90) is a member of a class of cellular proteins called chaperones. HSP90 forms a complex with additional proteins and acts to promote the correct conformation/folding, activity, and turnover of a wide array of proteins involved in cell growth and survival³⁰⁻³². Proteins that depend on correct HSP90 function (also known as "client" proteins) include Kit, Met, and Akt, among others. The activity of HSP90 requires ATP and inhibition of binding prevents the formation of the mature chaperone complex necessary for its intrinsic activity, eventually resulting in degradation of associated client proteins³³.

While HSP90 does not appear to be mutated or subject to gene amplification in cancer cells, it is expressed at high levels in a wide range of human tumors^{31,34}. This may be secondary to the general cellular stresses experienced by tumor cells including

abnormal microenvironment (hypoxia, acidosis, nutrient deprivation) and abnormal cell signaling/cycling (dysregulated oncogenes/tumor suppressor genes). These stresses may make cancer cells more reliant on adequate HSP90 function, particularly in the setting of mutated client proteins, thereby enhancing the therapeutic selectivity of HSP90 inhibitors³⁵. Furthermore, mutated client proteins exhibit conformational stress and require HSP90 activity to promote accurate folding. It has recently been shown that HSP90 extracted from tumor cells possesses 100 fold greater sensitivity to HSP90 inhibitors when compared to that isolated from normal cells³⁶. Additional selectivity of HSP90 inhibitors for tumor cells may also exist through the downregulation of multiple client proteins in tumor cells that depend on these proteins for cell survival and proliferation (i.e., Kit).

We recently investigated the expression and potential role of HSP90 in canine MCTs³⁷. We found HSP90 expressed in both normal canine bone marrow derived mast cells, as well as malignant mast cell lines and malignant mast cells freshly isolated from MCTs. Treatment of the cell lines and malignant mast cells ex vivo with a novel small molecule HSP90 inhibitor (STA-9090, Synta Pharmaceuticals) resulted in rapid downregulation of Kit activation and expression, ultimately resulting in growth inhibition and death of treated cells. STA-9090 was effective against malignant mast cells expressing either wild-type or mutant Kit, suggesting broad activity of this approach against malignant mast cell disease. Lastly, STA-9090 inhibited tumor growth in a mouse malignant mast cell tumor model. In summary, inhibition of HSP90 in malignant mast cells was effective at inducing cell death in the presence or absence of Kit mutations, indicating that this may be an effective approach for treating MCTs.

References

1. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1037-1051.
2. Galli SJ, Kitamura Y. Genetically mast cell deficient w/w^v and sl/sl^d mice. *Amer J Pathol* 1987;127:191-198.
3. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Advances in Immunology* 1994;55:1-95.
4. Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, et al. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990;633:213-224.
5. Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, et al. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell* 1990;63:195-201.
6. Tsai M, Takeishi T, Thompson H, et al. Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6382-

6386.

7. Taylor ML, Metcalfe DD. Kit signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14:517-535.
8. Sperr WR, Walchshofer S, Horny HP, et al. Systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukaemia: report of two cases and detection of the c-kit mutation Asp-816 to Val. *Br J Haematol* 1998;103:740-749.
9. Pignon J-M, Giraudier S, Duquesnoy P, et al. A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease. *Br J Haematol* 1997;96:374-376.
10. Nagata H, Okada T, Worobec AS, et al. c-kit mutation in a population of patients with mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:184-186.
11. Longley BJ, Jr., Metcalfe DD, Tharp M, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1609-1614.
12. Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res* 2001;25:571-576.
13. Buttner C, Henz BM, Welker P, et al. Identification of activating c-kit mutations in adult-, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: A possible explanation for divergent clinical behavior. *J Invest Dermatol* 1998;111:1227-1231.
14. Worobec AS, Semere T, Nagata H, et al. Clinical correlates of the presence of the Asp816Val c-kit mutation in the peripheral blood mononuclear cells of patients with mastocytosis. *Cancer* 1998;83:2120-2129.
15. Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor using mutation analysis in the proto-oncogene c-KIT. *J Vet Diagn Invest* 2001;13:341-345.
16. London CA, Galli SJ, Yuuki T, et al. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene *c-kit*. *Exp Hematol* 1999;27:689-697.
17. Ma Y, Longley BJ, Wang X, et al. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region of canine mast cell neoplasms. *J Invest Dermatol* 1999;112:165-170.
18. Downing S, Chien MB, Kass PH, et al. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res* 2002;63:1718-1723.
19. Ma Y, Cunningham ME, Wang X, et al. Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J Biol Chem* 1999;274:13399-13402.
20. Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet Pathol* 2002;39:529-535.
21. Wanebo HJ, Argiris A, Bergsland E, et al. Targeting growth factors and angiogenesis; using small molecules in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:279-292.
22. Shchemelinin I, Sefc L, Necas E. Protein kinase inhibitors. *Folia Biol (Praha)* 2006;52:137-148.
23. Wakeling AE. Inhibitors of growth factor signalling. *Endocr Relat Cancer* 2005;12 Suppl 1:S183-187.
24. Isotani M, Ishida N, Tominaga M, et al. Effect of Tyrosine Kinase Inhibition by Imatinib Mesylate on Mast Cell Tumors in Dogs. *J Vet Intern Med* 2008.
25. Marconato L, Bettini G, Giacoboni C, et al. Clinicopathological Features and Outcome for Dogs with Mast Cell Tumors and Bone Marrow Involvement. *J Vet Intern Med* 2008.
26. London CA, Hannah AL, Zadovskaya R, et al. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin Cancer Res* 2003;9:2755-2768.

27. London CA, Henry CJ, Rusk AW, et al. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (Palladia [TM], SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent mast cell tumors. . Proc 28th Annu Conf Vet Cancer Soc 2008.
28. Lachowicz JL, Post GS, Brodsky E. A phase I clinical trial evaluating imatinib mesylate (Gleevec) in tumor-bearing cats. J Vet Intern Med 2005;19:860-864.
29. Isotani M, Tamura K, Yagihara H, et al. Identification of a c-kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. Vet Immunol Immunopathol 2006;114:168-172.
30. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. Nat Rev Cancer 2005;5:761-772.
31. Maloney A, Workman P. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. Expert Opin Biol Ther 2002;2:3-24.
32. Powers MV, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. Endocr Relat Cancer 2006;13 Suppl 1:S125-135.
33. Connell P, Ballinger CA, Jiang J, et al. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. Nat Cell Biol 2001;3:93-96.
34. Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, et al. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. FEBS Lett 2004;562:11-15.
35. Whitesell L, Bagatell R, Falsey R. The stress response: implications for the clinical development of hsp90 inhibitors. Curr Cancer Drug Targets 2003;3:349-358.
36. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. Nature 2003;425:407-410.
37. Lin TY, Bear MD, Foley K, et al. The novel HSP90 inhibitor STA-9090 exhibits activity against Kit dependent and independent malignant mast cell tumors. Exp Hematol 2008;In Press.

Elettrochemioterapia

Enrico P. Spugnini DMV, Ph D,

Diplomato ACVIM (Oncology), Diplomato ECVIM-CA (Oncology)

L' elettrochemioterapia (ECT) è una nuova metodica terapeutica per il trattamento delle neoplasie solide, in particolar modo quelle a localizzazione cutanea e sottocutanea, mediante la somministrazione combinata di farmaci chemioterapici ed impulsi elettrici aventi forma d'onda appropriata.

In teoria la maggior parte dei farmaci chemioterapici avrebbero un' elevata efficacia a patto che riuscissero a raggiungere in quantità adeguata i loro bersagli intracellulari. A questo riguardo il principale ostacolo è rappresentato dalla membrana citoplasmatica; i farmaci antiblastici penetrano per diffusione (es. cisplatino) oppure mediante trasporto con carrier di membrana (es. molecole lipofobiche come il metotressato e la bleomicina). Numerosi studi in vitro hanno evidenziato che l' applicazione di impulsi elettrici, aventi appropriata forma d' onda, è in grado di aumentare il flusso transmembranario di molecole quali farmaci, plasmidi o proteine. I primi esperimenti in vivo furono effettuati da Okino e colleghi che osservarono un incremento della risposta alla doxorubicina in ratti aventi neoplasie indotte, dopo l' applicazione di impulsi esponenzialmente decadenti (1). Studi successivi hanno mostrato che altre molecole chemioterapiche possono essere veicolate mediante impulsi ad onda quadra, in particolare la bleomicina (aumento della captazione pari a 700 volte) ed il cisplatino (aumento della captazione pari a circa 8 volte). A partire dal 2001 sono stati pubblicati i primi lavori di elettrochemioterapia in oncologia veterinaria nei quali sono state utilizzate serie di 8 impulsi ad onda quadra (2-3) oppure treni ad onda bifasica (4-12). I tumori trattati con tale metodica includono sarcomi, melanomi, carcinomi squamocellulari e mastocitomi; le percentuali di risposta ottenute sono state molto elevate (anche 85%). Il farmaco di elezione in tutti questi studi è stata la bleomicina, in virtù della sua maggiore veicolazione rispetto ad altri farmaci, con il cisplatino utilizzato come farmaco di seconda linea. Tutti i protocolli elettrochemioterapici prevedono la somministrazione sistemica o locale di bleomicina seguita da 8 impulsi elettrici aventi voltaggio pari a 1300 V/cm e durata pari a 50 μ s. Il

trattamento viene effettuato mediante elettrodi a calibro oppure ad ago, fino a copertura della superficie tumorale. Per ciò che concerne i mastocitomi, Tozon e colleghi riportano di aver trattato direttamente mastocitomi cutanei nel cane ottenendo una risposta completa in 2 cani aventi un totale di 3 noduli neoplastici. Nel 2006 è stato pubblicato il primo lavoro di ECT per il trattamento del mastocitoma (8). In tale lavoro si è scelto di non attaccare direttamente tali neoplasie, dato il rischio di degranulazione mediata dall'impulso elettrico, ma piuttosto di impegnare l' ECT come adiuvante dopo escissione incompleta della neoplasia. Nel lavoro sono stati trattati un totale di 28 pazienti affetti prevalentemente da mastocitomi grado II e III incompletamente escissi. I cani sono stati trattati 7 giorni dopo l' escissione chirurgica della neoplasia con treni di impulsi ad onda bifasica aventi voltaggio pari a 1300 V/cm e durata pari a 50 μ s, previa infiltrazione del letto tumorale con bleomicina. Il trattamento elettrochemioterapico con onda bifasica + bleomicina è stato ripetuto dopo 7-14 giorni. La percentuale totale di risposta è stata dell' 85% con un tempo medio di ricorrenza pari a 52.7 ± 6.5 mesi. La terapia non ha avuto effetti collaterali fatto salvo un caso di deiscenza della ferita chirurgica. In un paziente con recidiva marginale è stato possibile ripetere il trattamento dopo una seconda escissione chirurgica, ottenendo una remissione della durata di 22 mesi. Gli impulsi ad onda bifasica presentano numerosi vantaggi rispetto alle altre onde impiegate in elettrochemioterapia: hanno maggiore potere permeabilizzante, sono meno dolorose per il paziente ed infine, essendo generate come treni d' impulsi e non come impulsi singoli, abbreviano di 8-10 volte la durata del trattamento (4-12). Il meccanismo d' azione dell' ECT non è del tutto compreso, tuttavia un recente studio ha evidenziato due effetti mediati dall' impulso ad onda bifasica: 1) distruzione del flusso di microvescicole rilasciato dalle cellule tumorali. 2) Riorganizzazione e raggruppamento delle proteine transmembranarie con conseguente aumento della permeabilizzazione (13). Più recentemente è stato riportato l' uso adiuvante di cisplatino nel trattamento di mastocitomi non completamente escissi associato all' applicazione di impulsi bifasici (14). In tutto sono stati trattati 23 cani con 17/23 esenti da recidiva con un DFI di 342 giorni. In conclusione, ECT è una possibile alternativa terapeutica per il trattamento di mastocitomi incompletamente escissi.

Referenze

1. Okino M, Mohri H. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *Jpn J Cancer Res.* 1987; 78:1319-21.
2. Tozon N, Sersa G, Cemazar M. Electrochemotherapy: potentiation of local antitumour effectiveness of cisplatin in dogs and cats. *Anticancer Res.* 2001; 21:2483-8.
3. Tozon N, Kodre V, Sersa G, Cemazar M. Effective treatment of perianal tumors in dogs with electrochemotherapy. *Anticancer Res.* 2005; 25: 839-45.
4. Spugnini EP, Porrello A. Potentiation of chemotherapy in companion animals with spontaneous large neoplasms by application of biphasic electric pulses. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003; 22:571-80.
5. Spugnini EP, Citro G, Porrello A. Rational design of new electrodes for electrochemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2005; 24:245-54.
6. Spugnini EP, Dragonetti E, Vincenzi B, Onori N, Citro G, Baldi A. Pulse-mediated chemotherapy enhances local control and survival in a spontaneous canine model of primary mucosal melanoma. *Melanoma Res.* 2006;16:23-7.
7. Spugnini EP, Baldi A, Vincenzi B, Bongiorno F, Bellelli C, Citro G, Porrello A. Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;59:375-81.
8. Spugnini EP, Vincenzi B, Baldi F, Citro G, Baldi A. Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. *Anticancer Res.* 2006; 26: 4585-9.
9. Spugnini EP, Vincenzi B, Citro G, Tonini G, Dotsinsky I, Mudrov N, Baldi A. Electrochemotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma in cats: A preliminary report. *Vet J.* 2007 Sep 27. [Epub ahead of print]
10. Spugnini EP, Baldi F, Mellone P, Feroce F, D'Avino A, Bonetto F, Vincenzi B, Citro G, Baldi A. Patterns of tumor response in canine and feline cancer patients treated with electrochemotherapy: preclinical data for the standardization of this treatment in pets and humans. *J Transl Med.* 2007; 5:48.
11. Spugnini EP, Citro G, Mellone P, Dotsinsky I, Mudrov N, Baldi A. Electrochemotherapy for localized lymphoma: a preliminary study in companion animals. *J Exp Clin Cancer Res.* 2007; 2: 343-6.
12. Spugnini EP, Vincenzi B, Citro G, Santini D, Dotsinsky I, Mudrov N, Montesarchio V, Laieta MT, Esposito V, Baldi A. Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely excised spontaneous canine sarcomas. *In Vivo.* 2007; 21: 819-22.
13. Spugnini EP, Arancia G, Porrello A, Colone M, Formisano G, Stringaro A, Citro G, Molinari A. Ultrastructural modifications of cell membranes induced by "electroporation" on melanoma xenografts. *Microsc Res Tech.* 2007; 70: 1041-50.
14. Spugnini EP, Citro G, Vincenzi B, Baldi A. Adjuvant CDDP-based electrochemotherapy for the treatment of incompletely excised mast cell tumors in dogs. *1st Worldvet cancer Meeting February 28th-March 1st 2008 Copenhagen (DK)*