

## Melanoma maligno orale del cane

Paolo Buracco

\*Dipl. ECVS, prof. Ordinario, Clinica Chirurgica Veterinaria, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Largo Paolo Braccini 2-5, 10095 Grugliasco (Torino)

Il melanoma maligno (MM) è il più frequente tra i tumori orali del cane (30-40% delle neoplasie della bocca). Ne sono predisposti cani di piccola taglia e quelli appartenenti a razze a mucosa pigmentata (Cocker Spaniel, Barbone, Pechinese, Gordon Setter, Chow Chow, Golden retriever e Bassotto). L'età media dei cani colpiti è 11,4 anni; la predisposizione di sesso è incerta (forse prevalenza nei maschi). L'eziologia è sconosciuta ma la predisposizione di alcune razze supporta una base genetica sottostante. Il MM si localizza a livello di mucosa gengivale (42%), labiale e buccale (38%), palatale (11%), e lingua [7%]; tonsille e faringe sono colpite più raramente (1%) ma possono essere sede di metastatizzazione locale. Il MM orale è localmente molto aggressivo, con crescita rapida e coinvolgimento dell'osso sottostante (mandibola o mascella) nel 57% dei casi. Il tasso metastatico è elevato (oltre 80%).

### DIAGNOSI

- Clinica: il MM orale cresce generalmente in forma sessile ma può anche essere peduncolato e variamente pigmentato o amelanotico. MM di meno di 1 cm sono spesso asintomatici e rinvenuti casualmente; quelli più grandi (3 o più cm) sono spesso ulcerati, sanguinanti e maleodoranti. Si possono rilevare anche mobilità localizzata/perdita di denti (per invasione ossea, fino alla frattura mandibolare), modificazioni del profilo facciale e perdita di saliva mista a sangue. Scialorrea, disfagia e difficoltà ad alimentarsi sono spesso presenti in caso di MM aborali; si osservano talvolta anche esoftalmo/deviazione del bulbo e dolore all'apertura della bocca (per invasione dell'orbita da parte di MM aborali dell'arcata superiore o della guancia) e stertuti/epistassi (per invasione nasale).
- L'esame citologico del tumore primario è eseguito da biopsia ad ago sottile o, preferibilmente, per impronta di *biopsie incisionali*. Il MM è un "grande imitatore", potendo in alcuni casi simulare neoplasie epiteliali (foglietti monostrato o aggregati di cellule molto coese tra loro), mesenchimali (cellule isolate di forma ovale o fusiforme), a cellule rotonde (cellule singole tondeggianti) o forme miste (Meinkoth et al 2014). Se pigmentati (granuli intracitoplasmatici di melanina), sono facilmente diagnosticabili; se amelanotici, sono spesso costituiti da cellule che mostrano un elevato grado di anaplasia e polimorfismo che rendono difficoltoso, se non impossibile, differenziarle da sarcomi o carcinomi poco differenziati (Friedrichs et al 2013).
- Metastasi: le prime sono in genere ai linfonodi regionali (mandibolari, retrofaringei mediali e parotidei, fino al 74% dei casi) (Piras et al 2017). Le loro dimensioni non sono un parametro accurato per stabilire il loro coinvolgimento (Williams e Packer, 2003; Grimes et al. 2017) e solo l'esame istologico (dopo linfadenectomia) permette la diagnosi definitiva.

L'interpretazione citologica di metastasi linfonodale può essere complicata per la presenza sia di melanociti neoplastici sia di *melanofagi* (macrofagi deputati alla raccolta di granuli di melanina, rilasciati per "incontinenza pigmentaria"). Le metastasi polmonari si sviluppano fino al 92% dei casi; altre possibili sedi sono fegato, surreni, cuore, reni ed encefalo.

- La diagnostica per immagini, trattandosi di un tumore aggressivo, la TC total body è fondamentale per la stadiazione clinica TNM (linfadenopatie altrimenti non svelabili [linfonodi retrofaringei mediali] e metastasi polmonari di piccole dimensioni [2mm] o agli organi addominali), e per stabilire se e come eseguire l'escissione chirurgica (invasione di osso, spazio retrobulbare, cavità nasali). La TC è pertanto preferibile rispetto l'esame radiografico (di cranio e torace) ed ecografico dell'addome.
- L'esame istologico (da biopsia incisionale o escissionale *en bloc*) è essenziale per la diagnosi definitiva. Il MM, in base all'aspetto morfologico delle cellule, può essere suddiviso in: a) *epiteliode* (20% dei casi); b) *fusato* (35% dei casi); c) *misto* (40% dei casi); d) *istotipi più rari* (a cellule dendritiche, balloniformi, a bersaglio e a cellule chiare, melanoma adenoide e forme con differenziazione osteocartilaginea da differenziare da osteo- o condro-sarcoma).
- I *MM poco aggressivi* sono generalmente differenziati, pigmentati e non ulcerati (talvolta necessaria la decolorazione con permanganato di potassio per visualizzare le caratteristiche cellulari e nucleari); l'indice mitotico è basso. I *MM aggressivi* (la maggior parte nel cavo orale) sono caratterizzati da intensa attività giunzionale e invasione sottomucosale. *Anche se questi tumori appaiono come noduli singoli ben definiti, l'esame istologico rivela, a livello intraepiteliale, più focolai neoplastici, pigmentati o non, per un'estensione laterale anche doppia rispetto alla neoplasia macroscopica.* Nei MM invasivi le cellule a crescita epiteliale hanno di solito forma e dimensioni uniformi e sono più differenziate rispetto a quelle sottomucosali; *possono essere le uniche a contenere pigmenti di melanina o a risultare positive all'esame immunoistochimico.* Le cellule della porzione più profonda del tumore mostrano invece grande variabilità di forma e dimensioni, sia del citoplasma sia del nucleo. Il *campione bioptico* dovrebbe includere il bordo della lesione e una porzione di mucosa intatta, tralasciando il centro ulcerato e spesso necrotico de MM (Ramos-Vara et al. 2000; Smith et al. 2002; Munday et al. 2017).
- L'*immunoistochimica* è fondamentale per la diagnosi definitiva. Il "cocktail" di anticorpi diretti verso Melan A, PNL2, TRP-1 e TRP-2 è caratterizzato da sensibilità di circa 93%, più alta rispetto a quella degli stessi anticorpi utilizzati singolarmente, e da specificità del 100% (Smedley et al. 2011 A; Giudice et al. 2012).
- L'esame istologico è indispensabile anche per l'*esame dei margini di escissione chirurgica*, e per fornire al clinico parametri utili per formulare una prognosi.
- I criteri più considerati per *pronosticare il comportamento biologico* del MM sono (Spangler et al. 2006; Bergin et al. 2011; Smedley et al. 2011 B):
  - *indice mitotico* (IM): numero di mitosi in 10 campi consecutivi ad alto ingrandimento (HPF). I MM con IM  $\geq 4$  per 10 HPF sono considerati più aggressivi;
  - *grado di atipie nucleari* (percentuale di nuclei alterati su 200 cellule contate). I MM con grado di atipie  $\geq 30\%$  hanno prognosi peggiore;

- *Ki67* (proteina nucleare presente durante tutte le fasi del ciclo cellulare [G1-S-G2-M]) e non nella fase di quiescenza (G0). La sua espressione è considerata come indice di crescita tumorale. Le cellule con nucleo marcato sono contate in una griglia di 1 mm<sup>3</sup> ad alto ingrandimento e il valore del Ki67 è determinato come numero medio di cellule positive in 5 diversi campi. I MM con Ki67  $\geq$  19,5% sono caratterizzati da comportamento più aggressivo.

## TERAPIA

Prevede il controllo locale della neoplasia (chirurgia e/o radioterapia), e il controllo della malattia metastatica con presidi adiuvanti quali chemioterapia e terapia immunologica.

- *L'escissione chirurgica* (mandibolectomia, maxillectomia, glossectomia, e resezione di labbro/guancia e ricostruzione con lembi locali o assiali) è, quando possibile, d'elezione (Boston et al. 2014). Il margine chirurgico deve essere, se possibile, di almeno 2-3 cm per l'osso e di 2 cm (anche se l'osso non appare eroso alla diagnostica per immagini) per i tessuti molli. *Contestualmente, si rimuovono i linfonodi regionali per la loro valutazione istologica.*
- La *radioterapia* è indicata come unico trattamento per MM inoperabili (Cancedda et al 2016) o come adiuvante dopo resezione incompleta. I protocolli ipofrazionati (8 Gy/settimana per 3 settimane o 9 Gy/settimana per 4 settimane) sembrano in grado di superare la radioresistenza del MM osservata in caso di iperfrazionamento (risposta dell'82%-94%, parziale del 25%-31% e completa del 51%-69%). L'irradiazione è estesa anche alle aree sede dei linfonodi regionali, anche se rimossi (Bateman et al. 1994; Proulx et al. 2003; Murphy et al. 2005).
- *Chemioterapia*: il carboplatino non ha fatto registrare miglioramenti in termini di sopravvivenza rispetto al solo trattamento locale (Rassnick et al. 2001; Murphy et al. 2005; Brockley et al. 2013; Boston et al. 2014; Dank et al. 2014). Farmaci sono stati anche erogati in forma d'impianto a rilascio lento di cisplatino o, mediante elettrochemioterapia, dopo inoculazione intralesionale o sistemica di bleomicina (Spugnini et al. 2006).
- Recentemente, è stata dimostrata l'espressione, nel MM, di recettori COX2 (la Ciclo-ossigenasi è stata associata a proliferazione tumorale, incremento della neoangiogenesi e infiltrazione linfocitaria e macrofagica). L'utilizzo di *piroxicam*, in associazione a farmaci come la *ciclofosfamida* e la *talidomide* in *regime metronomico* sembra associarsi a inibizione dell'angiogenesi e diminuzione dei microcapillari tumorali (Martinez et al. 2011; Choisunirachon et al. 2013; Gregorio et al. 2016). Anche l'uso di *toceranib fosfato*, inibendo recettori tirosin-chinasici come VEGF e PDGFR2 sembra potersi utilizzare in regime metronomico per il trattamento del MM (Wouda et al. 2017).
- *L'immunoterapia*, visto lo scarso successo delle terapie convenzionali, è l'alternativa "adiuvante" più studiata; di notevole interesse sono i vaccini a DNA. La *vaccinazione contro il cancro* si basa sul fatto che le cellule neoplastiche, a seguito di modificazioni genetiche, esprimono sulla superficie cellulare antigeni ed epitopi differenti rispetto alle cellule

normali. La vaccinazione ha lo scopo di “addestrare” il sistema immunitario a riconoscere questi nuovi epitopi e a generare linfociti B e T specifici (Cavallo et al. 2014). Il *vaccino a DNA* consiste in un plasmide codificante per uno o più TAA (*Tumor Associated Antigen*), con attivazione del sistema immunitario per una risposta umorale e cellulomediata diretta contro le cellule tumorali positive per quel TAA. Il primo vaccino a DNA ideato per il cane è stato ONCEPT (Merial). In uno studio di fase I del 2003, Bergman et al. dimostrano sicurezza ed efficacia di un vaccino a DNA codificante per la *tirosinasi umana* in cani affetti da MM (Bergman et al. 2003). Il protocollo prevede l’inoculo del plasmide per via transdermica, mediante un *needle-free injection system*, ogni 2 settimane per 4 trattamenti e successivi richiami semestrali. Il vaccino è risultato sicuro, con pochi effetti collaterali locali e nessuna tossicità sistemica (Bergman et al. 2003 e 2006; Grosenbaugh et al. 2011). Grazie a questi risultati è seguita l’approvazione, da parte del Dipartimento dell’Agricoltura Statunitense, di questo primo vaccino a DNA, anti-tirosinasi umana, per il trattamento del MM del cane. Studi più recenti hanno però messo in discussione la costante efficacia di ONCEPT poiché i cani trattati non hanno mostrato differenze significative di sopravvivenza rispetto ai cani solo operati (Ottnod et al. 2013; Treggiari et al. 2016; Verganti et al. 2016). I limiti di tale vaccino possono essere collegati alla scelta dell’antigene. La tirosinasi è espressa, infatti, in una percentuale limitata di MM; inoltre, non giocherebbe un ruolo oncogenico fondamentale per le cellule tumorali.

- La scelta del TAA-target è fondamentale per il successo della vaccinazione. Il *CSPG4*, oncoantigene di classe 1 espresso in circa il 60% dei MM (Mayayo et al 2011), ha un ruolo centrale nella proliferazione, adesione, migrazione e sopravvivenza dei melanociti neoplastici. Il *CSPG4* è caratterizzato da distribuzione ridotta nei tessuti sani e, nell’uomo, è over-espresso nelle cellule di melanoma, oligodendrocitoma, glioma, leucemia linfoblastica acuta, carcinoma renale, condrosarcoma, carcinoma pancreatico e carcinoma mammario. È espresso inoltre dai periciti presenti nel microambiente tumorale. Nel cane, il TTA-CSPG4 è over-espresso anche nell’osteosarcoma. L’iniezione tramite *elettroporazione* evoca un aumento della risposta immunitaria antigene-specifica. L’elettroporazione utilizza brevi impulsi elettrici per creare una temporanea permeabilizzazione della membrana cellulare e permettere così alle molecole di DNA (iniettate per via intramuscolare) di penetrare nella cellula; appena cessato lo stimolo elettrico, i “pori” di membrana si chiudono senza causare morte cellulare. L’elettroporazione funziona anche da adiuvante; infatti, l’inserimento degli aghi e gli impulsi elettrici erogati causano un danno tissutale locale con conseguente liberazione di citochine infiammatorie e richiamo di cellule dendritiche, macrofagi e linfociti nel sito d’inoculo, cui segue il trasporto ai linfonodi. Lo svantaggio principale della procedura è l’obbligo dell’anestesia generale (Impellizzeri et al 2014). I cani, per essere candidati alla vaccinazione adiuvante anti-CSPG4, devono essere portatori di MM orale positivo all’espressione di CSPG4 (Mayayo et al 2011); in tal caso, i cani entrano, dopo stadiazione clinica ed escissione chirurgica locale (tumore primario e linfonodi), in un protocollo che prevede due vaccinazioni a distanza di 15 giorni e successive vaccinazioni mensili (Piras et al 2017). I cani trattati con vaccinazione adiuvante anti-CSPG4 (human)

hanno fatto registrare una percentuale di sopravvivenza a 6, 12, 18, 24 mesi rispettivamente del 95,6%, 73,9%, 47,8%, 30,4% con sopravvivenza mediana di 684 giorni (Piras et al. 2017). Sono in corso ulteriori studi.

- *I cani affetti da MM orale trattati solo con chirurgia e/o radioterapia sono caratterizzati da una sopravvivenza mediana di 352 giorni, con una percentuale di pazienti vivi a 1 anno del 29% (Boston et al. 2014). L'uso della chemioterapia non modifica queste sopravvivenze.*

## BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Bateman KE, Catton PA, Pennock PW et al. 0-7-21 radiation therapy for the treatment of canine oral melanoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 8:267–272. 1994
2. Bergin I L, Smedley RC, Esplin DG et al. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Veterinary Pathology* 48:41–53, 2011
3. Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, et al. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clinical Cancer Research* 9:1284–1290, 2003
4. Bergman PJ, Camps-Palau MA, McKnight JA, et al. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine* 24(21):4582-5, 2006
5. Boston SE, Lu X, Culp WT, et al. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001-2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 245(4):401–407, 2014
6. Brockley LK, Cooper MA, Bennett PF. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. *New Zealand Veterinary Journal* 61(1), 25–31, 2013
7. Cavallo F, Aurisicchio L, Mancini R, Ciliberto G. Xenogene vaccination in the therapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 14:1427–42. 2014
8. Choisunirachon N, Jaroensong T, Yoshida K. Effects of low-dose cyclophosphamide with piroxicam on tumour neovascularization in a canine oral malignant melanoma-xenografted mouse model. *Veterinary and Comparative Oncology* 13(4): 424–432, 2013
9. Dank G, Rassnick KM, Sokolovsky Y, et al. Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. *Veterinary and Comparative Oncology* 12:78–84. 2014
10. Friedrichs KR, Young KM. Diagnostic Cytopathology in Clinical Oncology. In Withrow SJ, Vail DM, Page RL (eds), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed. St Louis, MO: WB Saunders, pp. 111–130, 2013
11. Giudice C, Ceciliani F, Rondena M, et al. Immunohistochemical investigation of PNL2 reactivity of canine melanocytic neoplasms and comparison with Melan A. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22(3): 389-94 2010
12. Gregorio H, Raposo TP, Queiroga FL. Investigating associations of cyclooxygenase-2 expression with angiogenesis, proliferation, macrophage and T-lymphocyte infiltration in canine melanocytic tumours. *Melanoma Research* 26:338-347, 2016
13. Grimes J, Matz B, Christopherson P, et al. Agreement Between Cytology and Histopathology for Regional Lymph Node Metastasis in Dogs With Melanocytic Neoplasms. *Veterinary Pathology* 54(4):579–587, 2017
14. Grosenbaugh DA, Leard T, Bergman PJ, et al. Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *American Journal of Veterinary Research* 72:1631–1638, 2011
15. Impellizeri JA, Ciliberto G, Aurisicchio L. Electro-gene-transfer as a new tool for cancer

- immunotherapy in animals. *Veterinary and Comparative Oncology* 12(4):310-318, 2014
16. Martinez CM, Peñafiel-Verdú C, Vilafranca M, et al. Cyclooxygenase-2 expression is related with localization, proliferation, and overall survival in canine melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology* 48:1204–1211, 2011
  17. Mayayo SL, Prestigio S, Maniscalco L, et al. Chondroitin sulfate proteoglycan-4: a biomarker and a potential immunotherapeutic target for canine malignant melanoma. *The Veterinary Journal* 190:e26–30, 2011
  18. Meinkoth JH, Cowell RL, Tyler RD. Cell Types and Criteria of Malignancy. In Cowell RL, Valenciano AC (eds), *Cowell and Tyler's Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*, 4th ed., Elsevier Inc. St. Louis, MO, USA, pp. 20-47, 2014
  19. Munday J.S, Löhr CV, Kiupel M. Tumors of the Alimentary Tract. In Meuten D.J, *Tumors in Domestic Animals*, 5th ed., Ames, Iowa, USA. John Wiley & Sons, Inc., pp. 499-601, 2017
  20. Murphy S, Hayes AM, Blackwood L, et al. Oral malignant melanoma: the effect of coarse fractionation alone or with adjuvant carboplatin therapy. *Veterinary Comparative Oncology* 3:222–229, 2005
  21. Ottnod JM, Smedley RC, Walshaw R, et al.; A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Veterinary Comparative Oncology* 11:219–29. 2013
  22. Piras LA, Riccardo F, Iussich S, Maniscalco L, Gattino F, Martano M, et al. Prolongation of survival of dogs with oral malignant melanoma treated by en bloc surgical resection and adjuvant CSPG4-antigen electrovaccination. *Veterinary Comparative Oncology* 15(3):996-1013, 2017.
  23. Proulx DR, Ruslander DM, Dodge RK, et al. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. *Vet Radiol Ultrasound*.44:352–359. 2003
  24. Ramos-Vara, JA, Beissenherz ME, Miller MA, et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Veterinary Pathology* 37:597–608, 2000
  25. Rassnick KM, Ruslander DM, Cotter SM, et al. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989–2000). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218:1444–1448, 2001
  26. Smedley RC, Spangler WL, Esplin DG, et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: A comparative review of the literature and goals for future investigation. *Veterinary Pathology* 48:54–72. 2011 B
  27. Smedley RC, Lamoureux J, Sledge DG, et al. Immunohistochemical diagnosis of canine oral amelanotic melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology* 48: 32–40. 2011 A
  28. Smith H, Goldschmidt H, Mcmanus PM. A Comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology* 39:651–678 2002
  29. Spangler WL, Kass PH. The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. *Veterinary Pathology* 43:136–149, 2006
  30. Spugnini E, Dragonetti E, Vincenzi B, et al. Pulse-mediated chemotherapy enhances local control and survival in a spontaneous canine model of primary mucosal melanoma *Melanoma Res* 16:23–27 2006
  31. Treggiari E, Grant JP, North SM. A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. *J Vet Med Sci* 78(5):845-50. 2016
  32. Verganti S, Berlato D, Blackwood L, et al. Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *Journal of Small Animal Practice* 58(1):10-16, 2017
  33. Williams LE, Packer RA. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222(9):1234–1236, 2003
  34. Wouda RM, Hocker SE, Higginbotham ML. Safety evaluation of combination carboplatin and toceranib phosphate (Palladia) in tumour-bearing dogs: A phase I dose finding study. *Veterinary*

Comparative Oncology 16:E52–E60, 2017

35. Cancedda S, Rohrer Bley C, Aresu L, Dacasto M, Leone VF, Pizzoni S, Gracis M, Marconato L. Efficacy and side effects of radiation therapy in comparison with radiation therapy and temozolomide in the treatment of measurable canine malignant melanoma. *Veterinary Comparative Oncology* 14(4):e146-e157, 2016.



Esempi clinici di melanoma melanotico, parzialmente melanotico e amelanotico

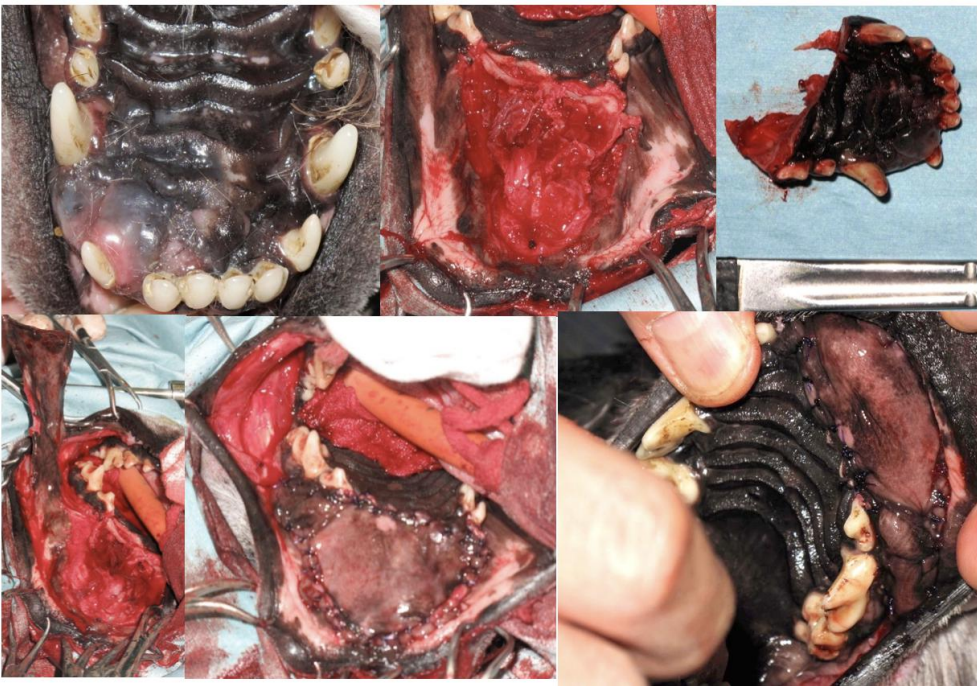


Escissione en bloc della guancia e ricostruzione (melanoma melanotico)



CSPG4=7, ki67=32%

Mandibolectomia orizzontale e linfoadenectomia per melanoma amelanotico



Maxillectomia rostrale bilaterale per melanoma parzialmente melanotico