



**uniss**  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA**

**CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE**

**INDIRIZZO:**

**CICLO: XXXII**

**Coordinatore del Corso Prof.ssa Fiammetta Berlinguer**

**VALUTAZIONE DI DUE DIFFERENTI TIPOLOGIE DI STRESS IN AMBITO ONCOLOGICO  
VETERINARIO**

**Tutor:**

**Prof./Dott. M.L. Manunta**

**Dottorando:**

**Dott. Elias Pirari**

**Anno Accademico 2018/2019**

In questo documento vengono descritti due lavori riguardanti argomenti di comune interesse per la medicina umana e per la medicina veterinaria, attinenti all'oncologia. Entrambi, argomenti supportati da ampie basi scientifiche ma accompagnati da tante domande a cui dare ancora risposta. Sebbene tali fenomeni possano essere osservati da differenti punti di vista, ciò che li accomuna potrebbe essere la chiave che permette di osservare varie sfaccettature di uno stesso problema. In questo caso si prende in considerazione lo Stress in due sue varianti. Uno studio è relativo allo stress ossidativo in cani affetti da tumore mentre l'altro è lo stress psicologico dei proprietari che ricevono la diagnosi di tumore nel proprio cane.

## INDICE

### VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO IN PAZIENTI ONCOLOGICI CANINI ATTRAVERSO L'UTILIZZO DEL d-ROMs TEST E BAP TEST.

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
Lo stress ossidativo	5
le specie reattive	5
Specie reattive dell'ossigeno (ROS)	6
Sostanze antiossidanti	7
Cause e conseguenze dello stress ossidativo	9
Ruolo dello stress ossidativo sul cancro	10
Misurazione dello stress ossidativo	13
d-ROMs test per la valutazione del potenziale ossidante	14
BAP test per la valutazione della barriera antiossidante	15
Stress ossidativo in medicina veterinaria	16
<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>18</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>18</b>
Selezione del campione	18
Procedure	19
Preparazione dei campioni	20
<b>ANALISI STATISTICA</b>	<b>21</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>22</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>26</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>30</b>

### PSICONCOLOGIA: VALUTAZIONE DELL'IMPATTO PSICOLOGICO DELLA DIAGNOSI DI TUMORE NEL PROPRIO CANE SU UN GRUPPO DI PERSONE ATTRAVERSO L'USO DELL'"IMPACT OF EVENT SCALE-REVISED" (IES-R)

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>34</b>
<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>37</b>
Selezione del campione	37
Procedure	38
<b>STATISTICA</b>	<b>39</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>40</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>48</b>

VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO IN PAZIENTI ONCOLOGICI CANINI  
ATTRAVERSO L'UTILIZZO DEL d-ROMs TEST E BAP TEST.

## INTRODUZIONE

### Lo Stress Ossidativo

L'omeostasi dello stato ossidoriduttivo fisiologico di un organismo viene mantenuto in maniera costante attraverso l'interazione di sostanze ossidanti e sostanze antiossidanti che, in condizioni normali, sono indispensabili per il funzionamento della cellula. Quando questo equilibrio è alterato a favore di una eccessiva e duratura presenza di sostanze ossidanti si parla di stress ossidativo(Dröge, 2002)(Figura 1).

Lo stress ossidativo è pertanto una condizione patologica in cui l'alterato equilibrio ossidoriduttivo provoca dei danni a carico delle molecole biologiche e alle cellule per via dell'eccessiva quantità di sostanze ossidanti rispetto alle sostanze antiossidanti, o a causa di un aumento della loro produzione o a causa di una riduzione della capacità fisiologica di difesa antiossidante (Dröge, 2002; Pietraforte & Straface, 2005).

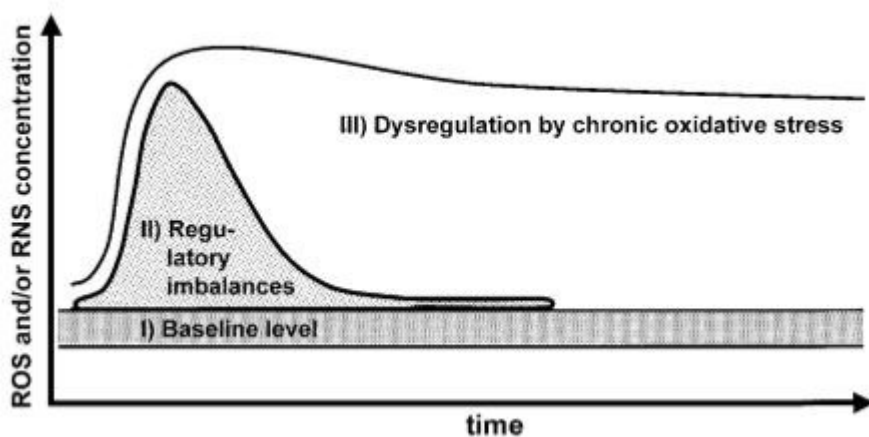


Figura 1- Dall'omeostasi allo stress ossidativo(Dröge, 2002)

### Le Specie Reattive

Tra le sostanze ossidanti, alcune sono radicaliche (es. radicali liberi) e altre non radicaliche (sostanze estremamente ossidanti ma non radicaliche) e pertanto è più corretto parlare in generale di Specie Reattive (RS) tra le quali, in maggiore misura, sono rappresentate le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS).(Dröge, 2002).

Per definizione i radicali liberi sono atomi o gruppi di atomi nei quali almeno un orbitale esterno è occupato da un solo elettrone "spaiato", quindi molecole instabili e capaci di interagire rapidamente con altre molecole. All'interno di un sistema biologico tali sostanze sono utili e talvolta indispensabili per i processi cellulari ma in quantità eccessiva o a

Elias Pirari, Valutazione di due differenti tipologie di stress in ambito oncologico veterinario, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

seguito di una insufficiente barriera antiossidante, tali molecole reagiscono con altre molecole biologiche alterandone la funzionalità (Rahal et al., 2014; Valko et al., 2007). Gli agenti ossidanti tendono a cercare una loro stabilità, riempiendo il loro orbitale con un altro elettrone che generalmente proviene da una molecola bersaglio alla quale questo elettrone viene strappato via. L'agente ossidante quindi attraverso questo meccanismo perde la sua pericolosità ma la molecola bersaglio privata dell'elettrone diventa a sua volta un radicale libero, perpetuando la reazione innescata, a danno di altre molecole (glucidi, lipidi, amminoacidi, proteine, acidi nucleici ecc).

### Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

Tra le RS si riportano le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), rappresentate in maggiore quantità.

L'ossigeno, nonostante sia vitale per gli organismi terrestri, può essere anche "tossico" perché, da esso o tramite esso, si generano numerose sostanze ossidanti che sottopongono le cellule ad un continuo stress al quale bisogna far fronte attraverso dei meccanismi di protezione e riparazione. A tale scopo intervengono gli agenti antiossidanti, agenti capaci di neutralizzare l'azione lesiva dei ROS. (Dröge, 2002; Halliwell, 1996).

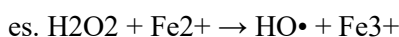
Tra i ROS si possono annoverare il radicale ossidrilico, l'anione superossido, radicale idroperossido, monossido d'azoto, perossido di idrogeno, l'ossigeno singoletto, l'acido ipocloroso, l'anione perossinitrito ecc. In minor misura rispetto ai ROS esistono altre sostanze dette Specie Reattive dell'Azoto (RNS), anche esse utili e indispensabili ma che in quantità eccessive e perduranti diventano dannose. (Figura 2)

	Radicals	Nonradicals
ROS	Superoxide, $O_2^{\bullet -}$ Hydroxyl, $OH^{\bullet}$ Peroxyl, $RO_2^{\bullet}$ Alkoxy, $RO^{\bullet}$ Hydroperoxyl, $HO_2^{\bullet}$	Hydrogen peroxide, $H_2O_2$ Hypochlorous acid, $HOCl$ Ozone, $O_3$ Singlet oxygen $^1\Delta_g$
RNS	Nitric oxide, $NO^{\bullet}$ Nitrogen dioxide, $NO_2^{\bullet}$	Nitrous acid, $HNO_2$ Dinitrogen tetroxide, $N_2O_4$ Dinitrogen trioxide, $N_2O_3$ Peroxynitrite, $ONOO^-$ Peroxynitrous acid, $ONOOH$ Nitronium cation, $NO_2^+$ Alkyl peroxy nitrites, $ROONO$

Figura 2 Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) e dell'Azoto (RNS) (Dröge, 2002)

La fonte di ROS e RNS è il metabolismo cellulare, a livello dei mitocondri (tramite il citocromo C e il complesso IV), nei perossisomi (tramite l'aminoacido ossidasi), nel reticolo endoplasmico (citocromo P450) ecc. Alcuni metalli in forma ionica, attraverso reazioni di Fenton, possono generare ROS. La reazione di Fenton è una reazione chimica

durante la quale si ha la rottura di un legame perossidico catalizzata da uno ione metallico di transizione (tipicamente Cu e Fe) nella sua forma ridotta:



Svariate ossidasi intracellulari (NADPH ossidasi, Ciclossigenasi, NO sintasi, Xantina ossidasi ecc) possono generare ROS. Alcuni di essi invece non sono endogeni, ad esempio gli xenobiotici elettrofili o l'esposizione a radiazioni ionizzanti portano alla formazione dei ROS (Halliwell, 1996; Valko et al., 2007).

### Sostanze antiossidanti

In chimica, le sostanze aventi proprietà antiossidanti sono dette molecole riducenti, in grado di cedere elettroni a molecole ossidanti che invece acquisiscono elettroni. Più in generale si definiscono sostanze antiossidanti tutte quelle che cedono elettroni o possono catalizzare reazioni di riduzione, capaci pertanto di controllare, in condizioni fisiologiche il potere ossidante delle specie reattive prima che possano causare danni alle macromolecole e di conseguenza alle cellule.

La regolazione dei ROS in condizioni di omeostasi è effettuata attraverso sistemi antiossidanti enzimatici e non enzimatici. Tra le molecole non enzimatiche si ricorda Glutazione, Flavonoidi, Vit. A, C ed E, mentre tra quelli enzimatici si riportano superossido dismutasi (SOD), superossido riduttasi, catalasi, glutazione perossidasi (GPX), glutazione reduttasi, perossiredossina (PRX) e Tioredossina (TRX). Queste molecole si ritrovano in vari compartimenti cellulari (citoplasma, reticolo endoplasmatico, mitocondri e perossisomi) e in differenti isoforme (Halliwell, 1996; Rahal et al., 2014; Valko et al., 2007).

	<b>Enzymatic</b>	<b>Non-Enzymatic</b>
<b>Antioxidants</b>	Copper-zinc SOD; CuZnSOD (SOD1)	Uric acid
	MnSOD (SOD2)	Bilirubin
	Endogenously synthesized Extracellular SOD (SOD3)	Glutathione (GSH)
	Catalase	Coenzyme Q10
	Glutathione peroxidase (GPx)	N-Acetylcysteine (NAC)
	Thioredoxin (Trx)	Melatonin
<b>Dietary substances</b>		Vitamin A, Vitamin C
		Vitamin E
		Folic acid
		Flavomoid Polyphenol

Figura 3 Le sostanze ossidanti - endogeni o esogeni - enzimatici o non enzimatici (Kayama et al., 2015)

Il Glutazione è un tripeptide che si può presentare in forma ossidata (GSSG) o ridotta (GSH). È la molecola antiossidante più abbondante nell'organismo, con una maggiore presenza a livello epatico in cui agisce sia come antiossidante diretto, sia come substrato di altri enzimi che controllano lo stato redox della cellula (glutaredossina, tioredossina, glutazione Elias Pirari, Valutazione di due differenti tipologie di stress in ambito oncologico veterinario, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

perossidasi ecc). L'omeostasi di tale molecola dipende dalla sua biosintesi, dal suo utilizzo e dalla sua rigenerazione. La biosintesi del GSH ridotto parte da un legame amminico tra glutammina e cisteina pertanto le riserve cellulari di cisteina rappresentano un fattore importante per questa reazione catalizzata da enzimi. Esiste inoltre un feedback negativo sugli enzimi che catalizzano questa reazione, dato proprio dal GSH ridotto. Il GSH neoformato diventa presto substrato di alcuni enzimi detti Glutazione Perossidasi (GPx) che degradano i perossidi organici, ma può fungere anche da antiossidante diretto, donando elettroni a molecole estremamente reattive, rendendole scarsamente reattive o dando origine alla sua forma ossidata GSSG. Il GSSG, grazie alla GSH reduttasi NADPH dipendente, torna alla sua forma originale pronto per riprendere il suo lavoro(Dröge, 2002; Valko et al., 2007)(Figura 4).

Esistono altre molecole capaci di neutralizzare i ROS: la Superossido Dismutasi (SOD) e la Catalasi ad esempio, rimuovono direttamente l'agente ossidante. Le SOD sono tante, esistono varie isoforme e ciascuna di esse può usare metalli come cofattori, trovandosi in differenti siti della cellula (citoplasma, nucleo, mitocondri). Le SOD sono capaci di catalizzare la dismutazione dell'anione superossido in ossigeno e acqua:



Le Catalasi invece sono emoproteine perossisomiali capaci di catalizzare la dismutazione del perossido di idrogeno portando alla produzione di acqua e ossigeno come prodotti finali:



È ubiquitaria ma non utilizza come substrati i perossidi organici(Dröge, 2002; Valko et al., 2007)(Figura 4).

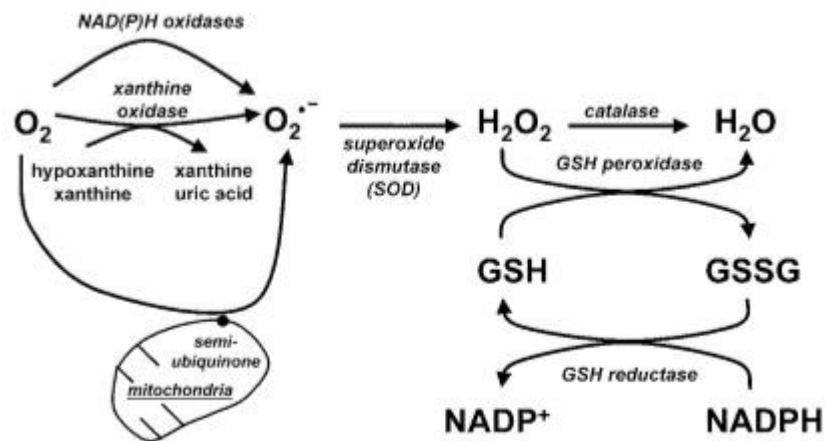


Figura 4 GSH, SOD, Catalasi (Dröge, 2002)

Altre molecole più piccole ad azione antiossidante non enzimatica sono ad esempio l'ascorbato, l'alfa-tocoferolo, la melatonina, il beta-carotene e l'urato(Dröge, 2002; Kayama et al., 2015; Valko et al., 2007) (Figura 3).

Il tocoferolo è liposolubile pertanto è in grado di prevenire la lipoperossidazione delle membrane cellulari, interrompendo la reazione a catena che caratterizza il processo. La vitamina C invece è idrosolubile e funziona da



“scavenger” dei radicali liberi presenti nei liquidi intra ed extracellulari. Inoltre è capace di rigenerare la Vit. E dopo che quest’ultima neutralizza i radicali liberi. La melatonina deriva da Triptofano e oltre ad avere grande importanza come regolatore dei ritmi circadiani, agisce anche come immunomodulatore, inibitore della crescita tumorale, regola la funzione retinica ed ha un importante effetto antiossidante diretto e indiretto, perché stimola la biosintesi di altri enzimi ad azione antiossidante (SOD)(Dröge, 2002; Valko et al., 2007).

### **Cause e conseguenze dello stress ossidativo**

In condizioni normali l’organismo produce radicali liberi grazie al metabolismo, alla sintesi di alcuni ormoni, i leucociti polimorfonucleati usano questi agenti ossidanti per difendere l’organismo dai batteri, l’ossido nitrico (NO) modula la contrattilità della muscolatura liscia vascolare, l’aggregazione piastrinica, l’adesione cellulare ecc, pertanto i radicali non devono essere ritenuti come nemici assoluti se non quando intervengono alcune cause che ne portano ad un eccessivo aumento come ad esempio radiazioni ed inquinamento, alimentazione, alcool, fumo, esercizio fisico incongruo, stress psico-emotivo, traumi, infiammazioni, infezioni, tumori, farmaci (Burton & Jauniaux, 2011; Møller et al., 2008; Rahal et al., 2014).

Per contro, in condizioni di buona salute, l’organismo riesce a prevenire i danni causati dagli agenti ossidanti, ma la riduzione dell’efficacia di tale sistema è dovuto ad un deficit assoluto o relativo di antiossidanti causato ad esempio da diete monotone, ipovitaminosi, malassorbimento, deficit dei meccanismi di trasporto o captazione di tali sostanze, fattori genetici o iatrogeni, sovraccarico del sistema ecc.(Dröge, 2002; Rahal et al., 2014; Valko et al., 2007)

Il meccanismo principale attraverso il quale i radicali liberi inducono queste alterazioni molecolari e cellulari è uno dei più diffusi. Quando le cellule vengono sottoposte all’azione dei fattori “stressori” esogeni riportati precedentemente, iniziano a produrre elevate quantità di radicali liberi tra cui anche il radicale idrossile (HO), capace di attaccare ogni tipo di substrato molecolare, strappandone un elettrone e radicalizzandolo, cioè rendendolo a sua volta un radicale che perpetua la reazione in modo indipendente e incontrollato. In presenza di ossigeno molecolare si formano quindi gli idroperossidi (ROOH), stabili ma potenzialmente ossidanti, espulsi all’esterno della cellula e quindi nella matrice extracellulare e nel sangue. In presenza di un metabolismo anaerobico, si ha invece un rilascio di cataboliti acidi che riducono il pH, causano alterazioni di conformazione della Transferrina che rilascia quindi il Fe in forma libera, che attraverso la reazione di Fenton provoca la scissione degli idroperossidi in radicali alcossilici e perossilici responsabili in ultima analisi dei danni ossidativi degli endoteli, delle proteine del plasma ecc.(Dröge, 2002; Rahal et al., 2014; Valko et al., 2007).

Esistono delle correlazioni tra lo stress ossidativo e numerose condizioni cliniche. L'invecchiamento e molteplici malattie sono correlate allo stress ossidativo. È stato visto di fatto come il potenziale danno ossidativo aumenta con l'avanzare dell'età e i ROS hanno una moltitudine di potenziali bersagli attraverso i quali favoriscono l'invecchiamento, ad esempio il mtDNA, il gene soppressore tumorale p53, svariate proteine. Con il progredire dell'età e dell'invecchiamento, la generazione fisiologica dei ROS inizia a sfuggire al controllo dei sistemi antiossidanti e si configura la loro tossicità, innescando il processo cosiddetto "toxic run-away" che è la base del coinvolgimento dei ROS nelle malattie età-dipendenti, che si manifestano nella seconda metà della vita di un individuo. Tra queste malattie ritroviamo l'artrite reumatoide, il diabete, il cancro, cardiopatie, neuropatie degenerative. (Dröge, 2002; Kayama et al., 2015; Secretariat et al., 2014; Valko et al., 2007; Vendemiale et al., 2011)

### **Ruolo dello stress ossidativo sul cancro**

Un'aumentata produzione di ROS può attivare segnali pro-tumorigenici, promuovendo la sopravvivenza e la proliferazione cellulare, causando danni al DNA e provocando instabilità genetica. Dall'altra parte però i ROS hanno anche attività di segnalamento anti-tumorale con morte cellulare stress ossidativo indotta. Le cellule tumorali esprimono grandi quantità di proteine antiossidanti per detossificare l'ambiente da un eccesso di ROS, per riportare all'equilibrio lo stato redox e nel frattempo sostenere la cellula tumorale conferendole resistenza all'apoptosi. Per questo motivo soprattutto in medicina umana si cerca di trovare il modo di poter manipolare i ROS come terapia antitumorale (Moloney & Cotter, 2018; Rahal et al., 2014).

Elevati livelli di ROS sono considerati oncogeni attraverso il loro effetto dannoso sul DNA (instabilità genetica), sulle proteine e sui lipidi. Essi fungono anche da molecole segnale nella crescita cellulare anomala, nello sviluppo di metastasi, nella resistenza all'apoptosi, nell'angiogenesi e talvolta nella differenziazione. Elevati livelli di ROS attivano vie di segnalamento per favorire la sopravvivenza delle cellule cancerogene, modificando il metabolismo, inibendo l'attività dei geni oncosoppressori, aumentando il metabolismo del glucosio, favorendo l'adattamento all'ipossia e generando mutazioni oncogeniche. La capacità antiossidante delle cellule tumorali riesce a ridurre l'eccesso di ROS dannosi anche per il tumore stesso, favorendo così il livello necessario per continuare a sopravvivere, progredire e resistere all'apoptosi. Sulla base di questo, i meccanismi utili per eliminare i ROS o per aumentarli ulteriormente fino a livelli tossici per le cellule tumorali, potrebbe essere una terapia potenzialmente efficace per il controllo dei tumori (Gorrini et al., 2013; Moloney & Cotter, 2018).

L'elevata quantità di ROS prodotta dalle cellule tumorali potrebbe derivare da una riduzione degli enzimi "scavenger", da un aumento del metabolismo del glucosio (effetto Warburg), dall'aumento dell'attività recettoriale cellulare, dell'attività oncogenica, da una maggiore presenza di fattori di crescita e citochine e da un aumento della produzione

Elias Pirari, Valutazione di due differenti tipologie di stress in ambito oncologico veterinario, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

mitocondriale di agenti ossidanti (NADPH ossidasi, Ciclossigenasi, lipossigenasi, xantina ossidasi e citocromo P450)(Halliwell, 1996; Moloney & Cotter, 2018; Valko et al., 2007).

I mitocondri sono uno dei siti principali in cui si formano i ROS, attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici, e tra i ROS la maggior parte è rappresentata dal perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) capace di fluire all'esterno del mitocondrio utilizzando un tipo specifico di acquaporine. Il NADPH ossidasi (NOX) è una famiglia di enzimi maggiormente coinvolti nella produzione di ROS. Esistono 7 isoforme (NOX 1-5 e DUOX 1-2) simili per conformazione e funzione enzimatica. Sono tutte proteine transmembranarie e con siti leganti il NADPH, FAD, 6 domini transmembranari e 4 istidine capaci di legare gruppi eme (porfirine). Questi enzimi trasferiscono gli elettroni attraverso le membrane generando O<sub>2</sub><sup>-</sup>, rapidamente convertito in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che tramite le acquaporine entra all'interno delle cellule interferendo con differenti sistemi di segnalazione cellulare. L'attivazione di ciascuno di questi sistemi inizia in risposta a diversi stimoli: stimolazione dei recettori da parte delle cellule B e T, da mediatori dell'infiammazione come lipopolisaccaridi (LPS), fattori di crescita e tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Ogni isoforma di NOX è maggiormente rappresentata in determinati tessuti e hanno tutte attività di trasduzione a cascata di vari segnali che arrivano alla cellula. I ROS prodotti dalle NOX agiscono come segnalatori secondari atti a stimolare la produzione di fattori di crescita. L'aumento dei ROS derivanti dalle NOX in corso di tumore ha due ruoli: stimolare la sopravvivenza cellulare e causare instabilità genetica; due caratteristiche importanti nella progressione del tumore. Elevati livelli di ROS prodotti dalle NOX sono coinvolti nella trasformazione e progressione di vari tumori in differenti siti (vescica, colon, seno, reni, polmoni, cute, esofago, ovaie, pancreas, prostata, stomaco e tiroide). In presenza di tali tumori, le NOX influenzano la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, la formazione di metastasi, l'invasione, l'angiogenesi e l'instabilità genomica. Anche l'elevata produzione di ROS da parte di ciclossigenasi (COX), lipossigenasi, xantine ossidasi, ossido nitrico sintetasi e citocromo P450 sono stati correlati ai tumori. Per tale motivo, gli inibitori delle COX (FANS) sono associati ad una riduzione del rischio di tumori al seno, ai polmoni, alle ovaie, all'esofago, alla prostata, stomaco e vescica(Genestra, 2007; Halliwell, 1996; Moloney & Cotter, 2018).

Con l'aumentare dei ROS aumentano anche i sistemi antiossidanti che però non possono competere con la grande quantità di ROS e questo permette di mantenere stabile il segnale pro-cancerogeno(Genestra, 2007; Moloney & Cotter, 2018).

I ROS possono essere il target di una terapia oncologica e le modalità attraverso le quali questo potrebbe avvenire sono due: aumentando i ROS a livelli tali da causare la morte cellulare nonostante i mezzi di resistenza della cellula tumorale o diminuendo drasticamente la loro produzione per prevenire la proliferazione cellulare(Genestra, 2007; Gorrini et al., 2013; Moloney & Cotter, 2018).

L'aumento di ROS verso valori critici tali da saturare i sistemi antiossidanti delle cellule tumorali per raggiungere infine la morte programmata viene attuata attraverso l'utilizzo di chemioterapici che causano danni irreparabili alle cellule e quindi la morte. Ad esempio, le antracicline (Doxorubicina), Cisplatino e Bleomicina portano ad un aumento dei ROS con conseguente attivazione di vie accessorie, che a loro volta attivano le vie deputate al raggiungimento dell'apoptosi. Un altro effetto è quello di riuscire ad attivare, attraverso elevati livelli di ROS, il gene oncosoppressore p53 che porta la cellula tumorale alla morte (Moloney & Cotter, 2018).

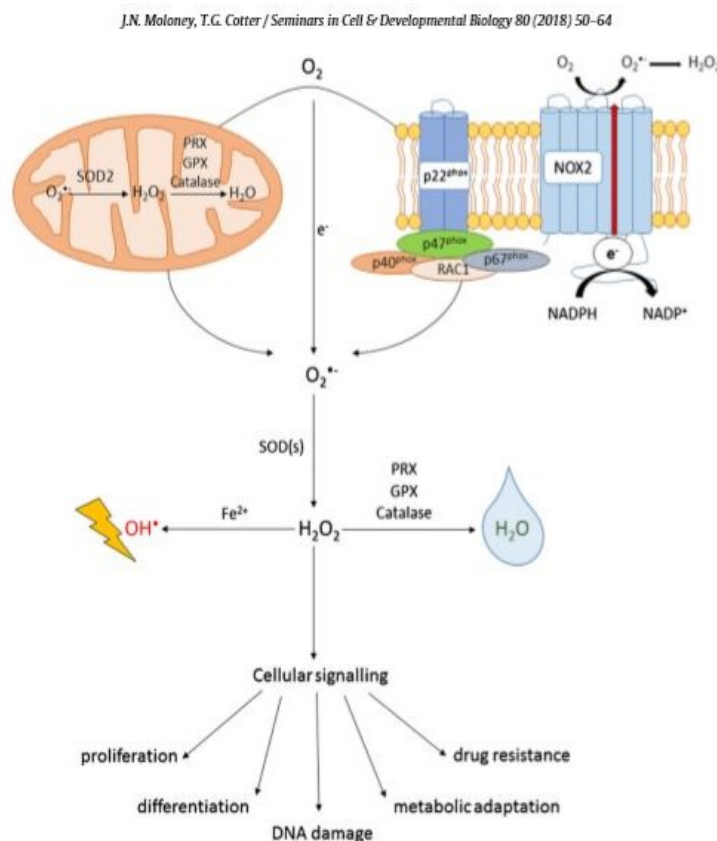


Figura 5 La sovrapproduzione di ROS in corso di patologie tumorali induce una serie di effetti biologici sintetizzati di seguito:

- Favoriscono la proliferazione cellulare e la sopravvivenza cellulare attraverso una complessa collaborazione con altri enzimi e fattori;
- Causano danni al DNA e causano instabilità genetica, di fatto molti tumori sono associati all'accumulo di varie mutazioni genetiche che si traducono in una anormale crescita cellulare, maggiore sopravvivenza della cellula e in alcuni casi blocco della differenziazione cellulare. L'accumulo di mutazioni geniche causa la resistenza di molte proteine tirosin chinasi ai loro inibitori.
- Favoriscono l'adattamento cellulare: le cellule tumorali si adattano ad un ambiente ipossico, mentre le cellule normali muoiono. Questa capacità è dovuta all'attivazione di un metabolismo alternativo del glucosio e questo processo viene definito effetto Warburg. Le cellule cancerose quindi diventano in grado di metabolizzare il glucosio anche in condizioni di ipossia, sfruttando diverse vie metaboliche;
- Livelli tossici di ROS nelle cellule inducono l'arresto del ciclo cellulare, la senescenza e l'apoptosi. A causa di un'elevata quantità di ROS, le vie che portano all'apoptosi (es via della Caspasi) vengono bloccate e come effetto successivo, aumentano ulteriormente i ROS prodotti;
- Inibiscono l'autofagia, un normale meccanismo di difesa contro i danni da stress ossidativo. Nelle cellule tumorali ciò non avviene a causa di mutazioni di geni coinvolti nell'espletamento di tale processo;
- Elevati livelli di ROS provocano inoltre resistenza ai farmaci antitumorali e alle radiazioni utilizzate in corso di radioterapia.

Le strategie per cercare di ridurre il più possibile la formazione di ROS sono in continua fase di studio. L'inibizione della produzione di ROS permetterebbe di bloccare la cascata di segnali che portano alla formazione e alla progressione del tumore, riducendo la sopravvivenza cellulare, la proliferazione, l'adattamento del metabolismo, livelli inferiori di danni al DNA e quindi una diminuzione della instabilità genetica. La metformina ad esempio è una molecola utilizzata per il controllo del diabete di tipo 2 ed ha un effetto pro-apoptotico nei confronti del tumore pancreatico attraverso la diminuzione dell'espressione delle NOX. L'inibizione delle NOX diminuisce di fatto l'attività pro-cancerogena in differenti tipi di tumori (Genestra, 2007; Moloney & Cotter, 2018; Rahal et al., 2014; Valko et al., 2007).

L'utilizzo di antiossidanti come "scavengers" dei ROS nella terapia contro il cancro rimane invece contraddittoria; di fatto, alcuni antiossidanti sono stati correlati ad un'incidenza maggiore del cancro. Tra gli antiossidanti che presentano questo tipo di correlazione si annoverano la Vit. A, E ed C (Khalil, 2012; Martínez et al., 2012; Sayin et al., 2014).

### **Misurazione dello stress ossidativo**

Non essendo una malattia come tradizionalmente la si intende, lo stress ossidativo è l'effetto della rottura di un equilibrio biochimico che influenza in modo subdolo lo sviluppo e il decorso di una grande varietà di processi morbosi. La diagnosi di stress ossidativo, pertanto, si basa su test biochimici capaci di evidenziare lo squilibrio tra produzione ed eliminazione di radicali liberi. I comuni esami di laboratorio spesso sono stati utilizzati nel tempo in campo umano per avere una misura indiretta del bilancio ossidativo ma nessuno di questi è risultato essere attendibile. Ad esempio è stato preso in considerazione l'acido urico che ha effetto antiossidante (Glantzounis et al., 2005) ma non è un marcatore affidabile perché esistono numerose sostanze antiossidanti quali ad esempio le vitamine C, E, carotenoidi, polifenoli alimentari ecc. Anche l'albumina, che ha la funzione di "adsorbire" i radicali liberi non è un indicatore affidabile (Ellidag et al., 2014). La proteina C reattiva è una proteina infiammatoria e in corso di infiammazione si ha una elevata produzione di radicali liberi, ma un valore basso della proteina C reattiva non esclude una condizione di stress ossidativo in atto (Kamezaki et al., 2008).

L'indagine più affidabile per misurare i radicali liberi è la spettroscopia di risonanza magnetica o di spin dell'elettrone (EPR o ESR) ma essendo piuttosto complessa e richiedente una strumentazione costosa e personale specializzato, tale tecnica non viene utilizzata normalmente se non per scopi di ricerca o per validare altri metodi di laboratorio (Palmieri & Sblendorio, 2007b; Rhodes, 2017). Inoltre, questa tecnica misura solo la produzione di radicali liberi e non gli antiossidanti. Sono nati pertanto dei metodi di misurazione dello stress ossidativo che permettono di misurare o la componente pro-ossidante (produzione di radicali liberi) o la componente antiossidante dello stress ossidativo. Non tutti i metodi hanno stessa valenza diagnostica ma tra questi, alcuni stanno prendendo piede nella pratica clinica, come ad Elias Pirari, Valutazione di due differenti tipologie di stress in ambito oncologico veterinario, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

esempio il panel messo a punto dal chimico Mauro Carratelli, che attraverso una tecnica fotometrica permette di determinare la capacità ossidante totale (dROMs test) e la barriera antiossidante plasmatica (BAP test) su sangue, plasma, siero, estratti tissutali ecc.(Palmieri & Sblendorio, 2007a)

#### **d-ROMs Test per la valutazione del potenziale ossidativo**

Il dROMs test permette di determinare il potenziale ossidativo attraverso un fotometro che determina la capacità ossidante del plasma costituita soprattutto dagli idroperossidi, una ampia classe di molecole biologiche che possono generare radicali liberi e per questo motivo vengono considerati dei marker specifici. Se eseguito su plasma, l'unico anticoagulante che non interferisce con la determinazione del fotometro è l'eparina ed inoltre è stato visto che il test può essere eseguito anche su campioni congelati di siero o plasma, anche dopo più cicli di congelamento e scongelamento senza incorrere in errori statisticamente significativi. Il dROMs test si basa sull'applicazione in provetta di ciò che accade in vivo con la reazione di Fenton. Il campione viene miscelato ad una soluzione tampone acida che induce il rilascio del Fe da parte della transferrina. Il Fe catalizza la reazione di trasformazione degli idroperossidi in radicali liberi (alcoossilici e perossilici) che essendo instabili, una volta entrati in contatto con un agente cromogeno (N,N-dietilparafenilendiammina, DEPPD), ne causano l'ossidazione (Alberti et al., 2000; Palmieri & Sblendorio, 2007a). In questa reazione il cromogeno da incolore assume una colorazione rosa e l'intensità del colore, sulla base del calcolo della variazione di assorbanza a 505nm, permette di risalire alla concentrazione degli idroperossidi presenti inizialmente nel campione in esame.(Alberti et al., 2000; Palmieri & Sblendorio, 2007a). Il valore finale viene espresso in U CARR, dal nome dell'inventore del dROMs test e una U CARR equivale a 0,08 mg/dl di una soluzione di perossido di idrogeno, pertanto, moltiplicando le U CARR per 0,08 si può ottenere la quantità di perossido di idrogeno espressa in mg/dl. Secondo alcuni autori si tratta di un test affidabile, preciso e ripetibile e che non subisce interferenze da parte dei più comuni analiti (Trotti et al., 2002). Questo test ha mostrato ottime performance analitiche con elevata linearità, precisione e accuratezza anche su una popolazione canina (Pasquini et al., 2008).

## **BAP Test per la misurazione della barriera antiossidante**

La valutazione dello stato antiossidante avviene invece attraverso il BAP test. Esso permette di determinare il potenziale biologico antiossidante (Biological Antioxidant Potential), anch'esso un test fotometrico che consente di misurare la concentrazione ematica di sostanze antiossidanti in grado di ridurre il Fe dalla forma ferrica alla forma ferrosa (Benzie & Strain, 1996). Il BAP test consente di ottenere la misura globale degli antiossidanti (acido urico, ac. Ascorbico, proteine, tocoferolo, bilirubina) e non la concentrazione di un singolo agente antiossidante per via dello scarso valore clinico che questo avrebbe (Benzie & Strain, 1996; Jansen & Ruskovska, 2013). Può essere eseguito su siero o plasma eparinato anch'esso. La procedura prevede la diluizione del campione in una soluzione colorata a base di sale ferrico e tiocianato. L'aggiunta del campione a tale soluzione causa una decolorazione misurata per via fotometrica a 505 nm.

Il BAP test si basa su ciò che viene osservato in natura. Di fatto l'ossidazione del ferro provoca il passaggio del metallo dalla forma ferrosa alla forma ferrica e dato che il Fe è un elemento ben rappresentato nell'organismo, è stato scelto come indicatore redox in questo test. Pertanto, una volta misurata l'assorbanza della soluzione a base di cloruro ferrico e di tiocianato, a seguito dell'aggiunta del campione in esame, la differenza di assorbanza misurata è direttamente proporzionale alla concentrazione di agenti in grado di riportare il ferro alla sua forma ferrosa e cioè al potenziale antiossidante biologicamente attivo (Martarelli et al., 2011). Anche questo test è stato validato attraverso la comparazione con i dati ottenuti con l'impiego della spettroscopia di risonanza dell'elettrone (EPR/ESR), in cui è stata utilizzata la bilirubina che in vitro possiede attività scavenger nei confronti dei radicali ossidrilici (Dohi et al., 2005; Palmieri & Sblendorio, 2007a). Gli esperimenti condotti in parallelo con il BAP test hanno messo in evidenza come i risultati delle due metodiche fossero sovrapponibili, pertanto il BAP test viene considerato realmente in grado di rilevare e quantificare in modo specifico e affidabile l'attività scavenger/antiossidante. Inoltre i risultati ottenuti dal BAP test si correlano in modo soddisfacente con i dati ottenuti attraverso un test detto FRAP assay, che misura l'attività plasmatica ferro-riducente e pertanto viene considerato il metodo di confronto più affine al BAP test (Benzie & Strain, 1996; Jansen & Ruskovska, 2013). I risultati del BAP test vengono espressi in micromoli di Fe ridotto per L di campione analizzato. Anche in questo caso il BAP test risulta essere un test affidabile, preciso e ripetibile ed è stato eseguito su una popolazione canina con l'ottenimento di una buona linearità, precisione e accuratezza (Pasquini et al., 2008).

## **Stress ossidativo in oncologia veterinaria**

Anche in medicina veterinaria lo stress ossidativo è stato trattato su diversi fronti. In campo oncologico la ricerca si orienta sulle dinamiche attraverso le quali lo stato redox di un paziente sia correlato allo sviluppo, alla progressione del cancro e a quale possa essere l'importanza del suo monitoraggio a fini prognostici o terapeutici. Esistono di fatto differenti studi in cui vengono valutati diversi parametri: non sempre prevedono l'utilizzo delle tecniche d-ROMs e BAP test, ma singoli analiti spesso vengono presi in esame in modo differente in base al tipo di tumore, allo stadio clinico e al grado istologico. Gli studi eseguiti prendono spesso in esame alcuni dei più comuni tumori riscontrabili nella pratica clinica come ad es. tumori mammari, linfomi, mastocitomi, osteosarcoma. Alcuni autori hanno valutato l'estensione della perossidazione dei lipidi del tessuto mammario di cani affetti da tumori maligni. Attraverso la ricerca di sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS), idroperossidi lipidici (LOOH), dieni coniugati (CD), ma anche degli enzimi antiossidanti (superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutatione perossidasi (GPx) e glutatione transferasi (GSH) e vitamina C) presenti nel tessuto mammario affetto da tumore e nel tessuto sano adiacente, questi studi dimostrano come tali sostanze si trovino in maggior misura nel tessuto tumorale rispetto al tessuto sano, in accordo con ricerche precedentemente eseguite (Kumaraguruparan et al., 2005). In un altro studio sono state valutate le concentrazioni di TBARS e alfa-tocoferolo su sangue, in associazione alla misurazione di colesterolo e trigliceridi, sul tessuto tumorale mammario e su tessuto mammario sano. Non sono state identificate differenze significative di TBARS e alfa tocoferolo nel siero tra cani malati e cani sani ma nel tessuto tumorale la concentrazione di TBARS risultava superiore mentre l'alfa-tocoferolo risultava più basso nel siero (Karayannopoulou et al., 2013).

Su una popolazione canina affetta da carcinoma mammario è stato osservato come i livelli di alcune citochine (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1, IL 6), NO (ossido nitrico), AOPP (ossidazione proteica) e FRAP (potenziale antiossidante) fossero aumentati rispetto ad un gruppo controllo. Inoltre l'attività di adenosina deaminasi (ADA) è risultata essere diminuita mentre la Butirilcolinesterasi (BChE) è diminuita solo nei carcinomi di alto grado. Le variabili investigate sono probabilmente correlate alla patogenesi della malattia suggerendo inoltre che ADA ha un possibile effetto modulatore sulla risposta infiammatoria (Machado et al., 2015).



Altri studi hanno rivolto l'attenzione allo stato redox di cani affetti da linfoma nei quali lo stato redox è stato misurato prima del trattamento ma anche in seguito a remissione. Vengono in questo caso presi in esame gli isoprostani totali (isoP) e malonildialdeide tra gli agenti ossidanti da una parte e il tocoferolo, la capacità di assorbanza dei radicali dell'ossigeno (ORAC) e Glutazione perossidasi (GSHPx) dall'altra. Il tocoferolo in corso di linfoma era diminuito significativamente, mentre il GSHPx e gli isoP risultavano significativamente più alti rispetto al gruppo controllo. A seguito del trattamento chemioterapico il tocoferolo risultava aumentato, mentre l'acido ascorbico era diminuito. Pertanto alcuni di questi analiti, a seguito del trattamento si normalizzano con la remissione, ma si suggeriscono ulteriori studi per determinare quanto possa essere di beneficio l'ausilio di sostanze antiossidanti durante il trattamento del linfoma nel cane (Winter et al., 2009). In cani affetti da linfoma, il livello di TBARS (sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico), AOPP (prodotti derivanti dall'ossidazione delle proteine) e FRAP (potere antiossidante ferrico-riducente) sono stati misurati prima e dopo (5 settimane) l'inizio della chemioterapia con protocollo CHOP. TBARS, AOPP e FRAP, risultavano aumentati nel siero di tutti pazienti affetti da linfoma, mentre dopo 5 settimane di trattamento, TBARS e AOPP risultavano ulteriormente aumentati ad indicare un effetto ossidante della terapia, mentre FRAP non presentava differenze significative. L'aumento dei valori era maggiore nei pazienti con uno stadio avanzato di malattia ma anche in quei pazienti sintomatici o nei linfomi a immunofenotipo T. (Bottari et al., 2015).

L'analita malonildialdeide (MDA), derivante dalla perossidazione dei lipidi, è stato usato come indicatore di stress ossidativo su cani affetti da tumore. Livelli elevati di MDA sarebbero associati a differenti tipi di tumore ma da solo non può essere utilizzato come "marker" per via della variabilità che il valore di questo analita può avere a seconda del laboratorio in cui viene eseguito il controllo, inoltre i risultati sono contrastanti su altri studi eseguiti (Macotpet et al., 2013).

In cani affetti da mastocitoma (MCT), i valori di d-ROMs appaiono aumentati in modo significativo rispetto ai pazienti sani mentre i valori di BAP diminuiscono significativamente. Non sono state notate differenze significative riguardanti il tocoferolo tra i cani affetti da mastocitoma e cani sani. Sulla base di questo vengono proposti ulteriori studi al fine di valutare il ruolo prognostico dello stress ossidativo e l'impatto che differenti approcci terapeutici possano avere su di esso (Finotello et al., 2014).

Elias Pirari, Valutazione di due differenti tipologie di stress in ambito oncologico veterinario, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

## **SCOPO DEL LAVORO**

Lo scopo del lavoro è quello di valutare lo stato ossidoriduttivo su cani affetti da tumore, afferenti all'Ospedale Didattico Veterinario del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Sassari grazie all'ausilio dei d-ROMs e BAP test.

## **MATERIALI E METODI**

### **Selezione del campione**

È stato eseguito uno studio prospettico osservazionale caso-controllo, in cui sono stati inclusi un gruppo di cani affetti da tumore (gruppo di studio A) e un gruppo di cani sani (gruppo controllo B). I criteri di inclusione nel gruppo di studio erano:

- Diagnosi di tumore maligno ottenuta mediante esame citopatologico o istopatologico;
- Assenza di patologie concomitanti stabilita mediante anamnesi, esame clinico e stadiazione;
- Dieta commerciale non addizionata in antiossidanti o alimentati con dieta casalinga;
- Attività fisica;
- Allevamento in ambiente domestico;
- Nessun trattamento farmacologico eseguito nel mese precedente (fatta esclusione per trattamenti antiparassitari).

Il gruppo di controllo era costituito da cani sani di proprietà, afferenti all'Ospedale Didattico Veterinario del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari.

I criteri di esclusione per il gruppo di controllo erano i seguenti:

- Alimentazione addizionata di antiossidanti o alimentati con dieta casalinga;
- Attività fisica intensa;
- Patologie in atto valutata attraverso anamnesi, visita clinica ed esami ematobiochimici e urinari;
- Somministrazione di farmaci nel mese precedente (fatta esclusione per trattamenti antiparassitari);
- Allevamento in ambiente rurale.

## **Procedure**

Per ciascun soggetto incluso nello studio sono stati registrati:

- Razza;
- Et ;
- Sesso;
- Stato riproduttivo (intero o sterilizzato);
- Tumore diagnosticato;
- Stadiao clinico;
- Sottostadio clinico;
- Grado istologico

La diagnosi di tumore maligno   stata eseguita attraverso esame citologico e/o esame istopatologico su tumori asportati chirurgicamente o su biopsie Trucut o Needle Core, con assegnazione del grado istologico qualora previsto.

I pazienti oncologici oggetto di studio sono stati sottoposti a stadiazione in accordo con i sistemi WHO (World Health Organization) (Owen, 1980; Withrow & MacEwan, 2001) e ciascun paziente   stato sottoposto ai seguenti esami:

- esami ematobiochimici (esame emocromocitometrico con formula, profilo biochimico, elettroforesi proteica del siero, profilo emostatico completo);
- esami urinari (esame chimico/fisico delle urine, rapporto PU/CU e osservazione del sedimento urinario);
- esami di diagnostica per immagini (radiografie del torace, ecografia addominale, TAC o RM).

### **Preparazione dei campioni**

Da ciascun paziente è stato ottenuto un campione di sangue venoso trasferito in provette contenente Litio-Eparina. I campioni di plasma sono stati separati per centrifugazione a 2500 rpm per 10 min subito dopo la raccolta. Una volta separato, il plasma eparinato è stato analizzato in giornata o conservato a temperature di -20°C. In ogni caso la processazione dei campioni conservati è avvenuta entro una settimana dalla raccolta, preparazione e conservazione. Il plasma eparinato è stato sottoposto a d-ROMs e BAP test in accordo con il metodo validato precedentemente da Pasquini et al., 2008.

#### 3.1.2) Analisi dei campioni

d-ROMs e BAP test sono stati eseguiti attraverso metodo spettrofotometrico (Free Radical Analytical System FRAS 4; Evolve, Langhirano, Italy) in accordo con la metodica indicata dall'azienda di produzione. Nel d-ROMs test i valori sono stati ottenuti attraverso reazione di Fenton (Pasquini et al., 2008) e quantificazione fotometrica della N,N-dietilparafenilendiamina successivamente ossidata dai radicali presenti nel campione (Alberti et al., 2000). I valori del BAP test sono stati ottenuti invece attraverso misurazione fotometrica della capacità del plasma di ridurre gli ioni Ferrico (Benzie & Strain, 1996). I risultati relativi al d-ROMs test sono stati espressi in UCARR (1 UCARR corrisponde a 0,08mg/dL di perossido di idrogeno), mentre i risultati relativi al BAP test sono stati espressi in  $\mu\text{mol/L}$ .

## ANALISI STATISTICA

La distribuzione delle variabili continue è stata valutata mediante il test di Shapiro-Wilk. Le variabili sono state espresse mediante media e deviazione standard (DS) o mediante mediana e *range* a seconda della loro distribuzione. Le differenze tra variabili continue, tra i due gruppi sono state valutate mediante test t-di Student o mediante test di Mann-Whitney a seconda della loro distribuzione. Le differenze tra variabili categoriche sono state valutate mediante test del chi quadro. L'effetto dell'età, del sesso e dello stato riproduttivo su BAP E d-ROMs è stato valutato mediante regressione lineare. Per tutti i test statistici utilizzati, valori di  $P < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi statistica è stata eseguita mediante software Stata 14.2 (StataCorp, Lakeway Drive, College Station, Texas USA).

## RISULTATI

In totale il numero di soggetti inclusi nello studio era di 59; Il gruppo di studio (A) era costituito da 31 soggetti malati mentre il gruppo controllo (B) era costituito da 28 soggetti sani. Le razze dei soggetti nel gruppo A erano così rappresentate: meticci (16 soggetti), Cane Corso (4 soggetti), Labrador Retriever (2 soggetti), Boxer (2 soggetti), Collie (1), Rottweiler (1), Maremmano (1), Pastore Tedesco (1), Beagle (1), Chihuahua (1), Maltese (1). Non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi riguardo l'età, il sesso e lo stato riproduttivo. L'età media del gruppo malati e del gruppo dei sani è rispettivamente di 10 anni e 9,5 anni. Le medie dei valori di BAP del gruppo di studio e del gruppo di controllo differiscono in maniera significativa (Tabella 1).

VARIABLE	CONTROL GROUP (n=28)	STUDY GROUP (n=31)	P value
Age, years, mean (SD)	10 (3.1)	9.5 (3)	0.47
SEX, male (%)	12 (43)	12 (39)	0.74
REPRO, intact (%)	13 (46)	20 (64)	0.16
d-ROMs (UCARR), mean (SD)	154 (32)	146 (35)	0.37
BAP ( $\mu\text{mol/L}$ ), mean (SD)	2247 (367)	2583 (314)	0.00

*Tabella 1 Confronto tra età, sesso, stato riproduttivo, d-ROMs e BAP tra il gruppo di studio e il gruppo di controllo*

Sull'intero gruppo di soggetti (n=59) è stata eseguito uno studio di regressione lineare per valutare l'effetto dell'età e del sesso (variabili indipendenti) su d-ROMs e BAP (variabili dipendenti). Età e sesso non hanno effetto significativo su d-ROMs. Il sesso non ha effetto significativo su BAP, al contrario, l'età ha un effetto significativo su BAP (relazione di tipo inverso)(tabella 2).

	<b>Beta (95% CI)</b>	<b>P value</b>
<b>d-ROMs</b>		
Age, years	-52 (-2.4; 3.4)	0.07
Sex	-10 (-31.7; 10.5)	0.32
<b>BAP</b>		
Age, years	-31 (-62; -0.23)	0.048
Sex	-143.4 (-369; 82)	0.2

*Tabella 2*

L'intero gruppo di soggetti del gruppo di studio (A) è stato successivamente stratificato sulla base del tipo di tumore come riportato nella tabella 3:

<b>CATEGORIA TUMORE</b>	<b>Numero soggetti</b>	<b>%</b>
linfomi	11	35.5
mastocitoma	4	13
carcinomi	14	45
sarcomi	2	6.5
<b>Totale</b>	<b>31</b>	<b>100</b>

*Tabella 3 Stratificazione dei soggetti sulla base del tipo di tumore diagnosticato*

Una ulteriore stratificazione è stata eseguita sulla base dell'estensione della malattia in “tumore localizzato” e “tumore sistemico” (metastatici e linfomi). I valori di d-ROMs e BAP di questi due gruppi sono stati comparati e non sono state identificate differenze significative tra i due gruppi (tabella 4).

VARIABLE	SISTEMICO (n=13)	LOCALIZZATO (n=18)	P value
<b>DROMS, mean (SD)</b>	<b>154.2 (32.6)</b>	<b>140.6 (36.2)</b>	<b>0.3</b>
<b>BAP (µmol/L), median (range)</b>	<b>2598 (215.3)</b>	<b>2573 (375)</b>	<b>0.8</b>

*Tabella 4 d-ROMs e BAP: valori medi dei gruppi “sistemico” e “localizzato”*

I due gruppi più consistenti di tumore erano rappresentati dal gruppo dei linfomi (35,5%) e dal gruppo dei carcinomi (45%) tra i quali sono stati confrontati i rispettivi valori di d-ROMs e BAP senza osservare differenze statisticamente significative (Tabella 5).

VARIABLE	Linfomi (n=11)	Carcinomi (n=18)	P value
<b>DROMS (UCARR), mean (SD)</b>	<b>148 (32)</b>	<b>151 (38)</b>	<b>0.8</b>
<b>BAP (µmol/L), mean (SD)</b>	<b>2736 (306)</b>	<b>2505 (261)</b>	<b>0.05</b>

*Tabella 5 d-ROMs e BAP: valori medi del gruppo "linfoma" e del gruppo "carcinoma"*

Infine la media dei valori di d-ROMs e BAP dei gruppi “linfomi” e “carcinomi” sono stati confrontati con la media dei valori del gruppo di controllo (Tabella 6)(Tabella 7).

VARIABLE	CONTROL GROUP (n=28)	CARCINOMI (n=14)	P value
<b>DROMS (UCARR), mean (SD)</b>	<b>154 (32)</b>	<b>151 (38)</b>	<b>0.7</b>
<b>BAP (µmol/L), mean (SD)</b>	<b>2247 (306)</b>	<b>2505 (261)</b>	<b>0.02</b>

*Tabella 6 Differenza delle medie dei valori d-ROMs e BAP tra gruppo di controllo e il gruppo “carcinomi”*



<b>VARIABLE</b>	<b>CONTROL GROUP (n=28)</b>	<b>LINFOMI (n=11)</b>	<b>P value</b>
<b>DROMS (UCARR), mean (SD)</b>	<b>154 (32)</b>	<b>148 (32)</b>	<b>0.6</b>
<b>BAP (µmol/L), mean (SD)</b>	<b>2247 (306)</b>	<b>2736 (306)</b>	<b>0.00</b>

*Tabella 6 Differenza delle medie dei valori di d-ROMs e BAP tra il gruppo di controllo e il gruppo "linfomi"*

L'unica differenza significativa è stata evidenziata per la media dei valori di BAP rispetto alla media dei valori di BAP dei due gruppi "carcinomi" e "linfomi" ( $P < 0.02$  e  $P < 0.004$  rispettivamente).

## DISCUSSIONE

Al momento attuale esiste un solo studio in cui i valori di d-ROMs e BAP sono stati studiati su cani affetti da tumore ma la differenza principale risiede nella casistica analizzata. Nel presente studio vengono esaminati cani aventi differenti tipi di tumore in diversi stadi clinici e di differente grado istologico (se disponibile), mentre in un altro studio, il gruppo in esame era formato da soli soggetti affetti da mastocitoma (Finotello et al., 2014), per i quali non sono state osservate correlazioni tra il grado istologico, lo stadio clinico e il sottostadio rispetto ai valori di d-ROMs che risultavano essere aumentati nei cani con mastocitoma rispetto al gruppo di controllo. Nel nostro studio i valori di d-ROMs non differivano significativamente tra gruppo di cani malati e sani, ma in entrambi i gruppi il valore di d-ROMs risultava comunque superiore rispetto ai limiti di normalità compresi tra 56.4 e 91.4UCARR stabiliti precedentemente su una popolazione canina di Labrador (Pasquini et al., 2008). Vari studi descrivono i mastociti come cellule capaci di produrre grandi quantità di ROS a seguito di vari stimoli anche se non si conosce ancora la natura specifica di tali ROS (Brooks et al., 1999; Tsinkalovsky & Laerum, 1994) e altri studi riportano come i ROS abbiano un effetto stimolante la degranolazione mastocitaria a seguito della loro aumentata produzione (Gushchin & Tsinkalovsky, 1992; Nakano et al., 2005). I cani con mastocitoma riportati nel nostro studio erano in numero limitato (n 4) e non è stato possibile ottenere una maggiore quantità di dati tali da poter calcolare l'influenza di questi soggetti sul nostro campione. È stato possibile farlo invece per i due sottogruppi di tumore maggiormente rappresentati nella nostra casistica, carcinomi (n14) e linfomi (n11). Tra questi due sottogruppi non vi erano differenze significative per quanto riguarda i valori di d-ROMs e confrontando singolarmente i rispettivi valori di d-ROMs con quello del gruppo di controllo non vi erano comunque differenze significative, diversamente da quanto invece si riporta nello studio di Finotello et al. 2014. È possibile che tale differenza di risultati possa essere dovuta anche alla tipologia di tumore maggiormente rappresentata. Per valutare se l'estensione della malattia potesse avere un ruolo significativo sul valore di d-ROMs, sono stati confrontati tali valori relativi ai due sottogruppi di soggetti in cui il tumore era considerato localizzato (n 18) o sistemico (n 13) e anche in

questo caso non sono state evidenziate differenze significative, similmente a quanto riportato da Finotello et al. (2014) in cui lo stadio clinico e il volume tumorale non sembrano influire sul pattern ossidativo, suggerendo invece che l'infiammazione correlata al tumore possa avere un effetto maggiore sulla produzione dei ROS rispetto al tumore stesso (Finotello et al., 2014).

I valori di BAP ottenuti dal gruppo di studio e dal gruppo di controllo differiscono invece in modo significativo e inverso rispetto a quanto ottenuto precedentemente (Finotello et al., 2014). Di fatto, il valore di BAP dei soggetti malati è risultato essere maggiore rispetto al gruppo di controllo. Nel nostro studio, per entrambi i gruppi, i valori di BAP erano all'interno dei normali valori di riferimento, 1440–3260  $\mu\text{mol/L}$  (Pasquini et al., 2008). Inoltre i valori di BAP dei sottogruppi “carcinomi” e “linfomi” non differivano significativamente, così come per i valori di BAP dei sottogruppi “sistemico” e “localizzato”. Una differenza significativa è stata invece osservata confrontando il valore di BAP dei carcinomi e dei linfomi rispetto al valore medio del gruppo di controllo. Tra i due gruppi, il valore di BAP del sottogruppo dei linfomi manifesta una maggiore differenza rispetto al gruppo di controllo. Uno studio precedente osserva come la concentrazione di Glutazione Perossidasi e la Capacità di Assorbimento dei Radicali dell'Ossigeno (ORAC) risultassero aumentati nei cani affetti da linfoma rispetto al gruppo di controllo (Winter et al., 2009). ORAC permette di misurare composti idrofilici tra cui acido ascorbico e acido urico mentre BAP ha la capacità di misurare la capacità antiossidante nel suo complesso per cui si tratta di due metodologie e analiti differenti. L'ipotesi per la quale valori di Glutazione Perossidasi e ORAC potessero essere aumentati è relativa all'instaurarsi di un meccanismo compensatorio che potrebbe giustificare anche nel nostro studio un tale aumento di BAP nei soggetti malati rispetto ai soggetti sani (Winter et al., 2009). La barriera antiossidante di fatto tenderebbe ad aumentare in corso di stress ossidativo per compensare lo squilibrio, fino a che non si ha un esaurimento tale per cui si manifesta una situazione di stress ossidativo conclamato e scompensato (Genestra, 2007; Moloney & Cotter, 2018; Rahal et al., 2014). Una situazione in cui i valori di BAP sono ottimali mentre i valori di d-ROMs sono superiori ai limiti della norma potrebbe essere compatibile con una condizione di “potenziale” stress ossidativo ancora compensato dai sistemi antiossidanti. Altri studi hanno comparato le concentrazioni di Glutazione Perossidasi e Superossido Dismutasi tra cani con tumori mammari maligni e cani sani notando un aumento di entrambi gli enzimi nel sangue dei soggetti malati anche se non in modo significativo mentre le concentrazioni di TBARS

(Sostanze Reattive all'Acido Tiobarbiturico) e dei gruppi -SH erano simili tra i due gruppi ipotizzando anche in questo caso che un aumento dell'attività enzimatica antiossidante potesse derivare da un meccanismo protettivo contro la malattia tumorale(Szczubiał et al., 2004).

E' necessario considerare che diversi fattori possono influire sull'equilibrio ossidativo e sebbene vi sia stata una selezione dei soggetti del gruppo controllo sulla base di diversi fattori (età, dieta, esercizio fisico, ambiente di allevamento, assenza di malattie concomitanti o assenza di trattamenti farmacologici), non è possibile escludere completamente la presenza di malattie sub-cliniche e non diagnosticate o non riferite dai proprietari dei cani appartenenti al gruppo di controllo (Freeman et al., 1999; Halliwell, 1996; Machado et al., 2015; Mastellone et al., 2020; Pasquini et al., 2010; Valko et al., 2007). Sulla base di quanto riportato in un precedente lavoro, entrambi i gruppi di cani esaminati nel nostro studio presentavano un valore di d-ROMs compatibile con una condizione di stress ossidativo ed un valore di BAP considerato ottimale(Sechi et al., 2015) in entrambi i gruppi, sebbene il gruppo dei cani malati avessero dei valori significativamente aumentati. I valori di d-ROMs dei cani esaminati da Sechi et al. presentavano in alcuni casi valori superiori a quelli di riferimento sebbene tutti i soggetti fossero considerati apparentemente sani, così come nel nostro studio la media del valore di d-ROMs del gruppo controllo risultava essere superiore ai limiti di riferimento sebbene siano stati reclutati cani per i quali non vi era evidenza di malattie sottostanti. Questo evento potrebbe essere l'effetto di un accumulo dei ROS nell'organismo con l'avanzare dell'età. Nello studio eseguito da Sechi et al. e nel nostro studio, l'età media dei soggetti risultava essere compresa tra gli 8 e i 10 anni, mentre nello studio eseguito su un gruppo di 130 cani di razza Labrador, con età compresa tra 1 e 5 anni, è stato testato il metodo di misurazione di d-ROMs e BAP ottenendo inoltre i range di riferimento e i valori medi rispettivamente di 73,9 UCARR e 2446  $\mu\text{mol/l}$  (Pasquini et al., 2008). In un lavoro preliminare non pubblicato, abbiamo ottenuto un pool di 49 cani sani di età variabile compresa tra 1 e 14 anni sui quali è stata eseguita una analisi di regressione lineare che ha messo in evidenza che la variante età influenza in maniera significativa ( $p=0.00$ ) il valore dei dROMs e BAP. Per ogni anno di età, i dROMS aumentano di circa 6.9 punti mentre il valore di BAP diminuisce di circa 36 punti. Al momento attuale non è possibile valutare se la razza e la taglia possa invece avere una influenza sui valori di d-ROMs e BAP.

Questo lavoro ha diverse limitazioni; il numero dei cani affetti da tumore risulta essere ridotto a causa dei criteri di selezione adottati. Tra i soggetti del gruppo di studio vi è difformità per quanto riguarda il metodo di diagnosi (citologia vs istologia). I tipi di tumore risultano essere differenti tra i vari soggetti. Per alcuni tumori è stato possibile ottenere il grado istologico mentre per altri non è stato possibile. Inoltre, i soggetti non manifestavano uniformità di stadio clinico tale da poter utilizzare questo parametro nello studio statistico, per tale motivo sono stati creati due gruppi sulla base dell'estensione del tumore (localizzato vs sistemico/metastatico). Queste suddivisioni hanno portato ad ottenere dei gruppi di studio numericamente inferiori con conseguente riduzione della significatività statistica. Ulteriori studi con un numero maggiore di soggetti potrebbero essere utili per investigare lo stress ossidativo in cani affetti da differenti tipi di tumore nei quali stadio clinico e grado istologico possano avere maggiore influenza sull'analisi statistica. A conoscenza dell'autore, il lavoro qui presentato è al momento attuale l'unico lavoro in cui siano stati valutati i valori di d-ROMs e BAP su cani affetti da diversi tipi di tumore, comprendente due gruppi consistenti di linfomi e carcinomi, mentre una parte di informazioni, sebbene con risultati differenti sono stati ottenuti da cani affetti da mastocitoma (Finotello et al., 2014). L'ampliamento della casistica attuale, ha lo scopo di valutare se differenti istotipi tumorali possano influenzare il pattern ossidoriduttivo. Considerata la mancanza di differenze statisticamente significative tra cani sani e malati nel nostro studio è difficile poter trarre una conclusione per la quale l'aumento dei ROS possano essere responsabili nella carcinogenesi ma l'alterazione dei valori di BAP suggerisce l'instaurarsi di un meccanismo compensatorio volto a neutralizzare i ROS correlati al tumore o all'infiammazione eventualmente ad esso associata. Ulteriori studi serviranno a confermare tali dati, a indagare l'eventuale valore prognostico di tali determinazioni e il loro ruolo nel monitoraggio delle varie strategie di trattamento associate o meno all'eventuale ruolo terapeutico degli antiossidanti con la dieta.

## BIBLIOGRAFIA

- Alberti, A., Bolognini, L., Macciantelli, D., & Caratelli, M. (2000). The radical cation of N,N-diethyl-para-phenylendiamine: A possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Research on Chemical Intermediates*, 26(3), 253–267. <https://doi.org/10.1163/156856700X00769>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bottari, N. B., Munhoz, T. D., Torbitz, V. D., Tonin, A. A., Anai, L. A., Semolin, L. M. S., Jark, P. C., Bollick, Y. S., Moresco, R. N., França, R. T., Lopes, S. T. A., Stefani, L. M., Tinucci-Costa, M., & Da Silva, A. S. (2015). Oxidative stress in dogs with multicentric lymphoma: Effect of chemotherapy on oxidative and antioxidant biomarkers. *Redox Report*, 20(6), 267–274. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000037>
- Brooks, A. C., Whelan, C. J., & Purcell, W. M. (1999). Reactive oxygen species generation and histamine release by activated mast cells: Modulation by nitric oxide synthase inhibition. *British Journal of Pharmacology*, 128(3), 585–590. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702838>
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 25(3), 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
- Dohi, K., Satoh, K., Ohtaki, H., Shioda, S., Miyake, Y., Shindo, M., & Aruga, T. (2005). Elevated plasma levels of bilirubin in patients with neurotrauma reflect its pathophysiological role in free radical scavenging. *In Vivo*, 19(5), 855–860.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Ellidag, H. Y., Eren, E., Yilmaz, N., & Cekin, Y. (2014). Oxidative stress and ischemia-modified albumin in chronic ischemic heart failure. *Redox Report*, 19(3), 118–123. <https://doi.org/10.1179/1351000213Y.0000000083>
- Finotello, R., Pasquini, A., Meucci, V., Lippi, I., Rota, A., Guidi, G., & Marchetti, V. (2014). Redox status evaluation in dogs affected by mast cell tumour. *Veterinary and Comparative Oncology*, 12(2), 120–129. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00343.x>
- Freeman, L. M., Brown, D. J., & Rush, J. E. (1999). Assessment of degree of oxidative stress and antioxidant concentrations in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 215(5), 644–646.
- Genestra, M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*, 19(9), 1807–1819. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.04.009>
- Glantzounis, G., Tsimoyiannis, E., Kappas, A., & Galaris, D. (2005). Uric Acid and Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*, 11(32), 4145–4151. <https://doi.org/10.2174/138161205774913255>
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 12, Issue 12, pp. 931–947). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>
- Gushchin, I. S., & Tsinkalovsky, O. R. (1992). Dissociation of histamine secretion and changes of oxidantantioxidant system indices in immunologically and nonimmunologically activated rat mast cells. *Agents and Actions*, 36(2 Supplement), C279–C282. <https://doi.org/10.1007/BF01997351>
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, 16(1), 33–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.16.1.33>
- Jansen, E. H. J. M., & Ruskovska, T. (2013). Comparative analysis of serum (Anti)oxidative status parameters in healthy persons. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6106–6115. <https://doi.org/10.3390/ijms14036106>
- Kamezaki, F., Yamashita, K., Kubara, T., Suzuki, Y., Tanaka, S., Kouzuma, R., Okazaki, M., Tasaki, H., & Otuji, Y. (2008). Derivatives of reactive oxygen metabolites correlates with high-sensitivity C-reactive protein. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 15(4), 206–212. <https://doi.org/10.5551/jat.E538>
- Karayannopoulou, M., Fytianou, A., Assaloumidis, N., Psalla, D., Constantinidis, T. C., Kaldrymidou, E., & Koutinas, A. F. (2013). Markers of lipid peroxidation and  $\alpha$ -tocopherol levels in the blood and neoplastic tissue
- Elias Pirari, Valutazione di due differenti tipologie di stress in ambito oncologico veterinario, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

of dogs with malignant mammary gland tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, 42(3), 323–328. <https://doi.org/10.1111/vcp.12064>

Kayama, Y., Raaz, U., Jagger, A., Adam, M., Schellinger, I. N., Sakamoto, M., Suzuki, H., Toyama, K., Spin, J. M., & Tsao, P. S. (2015). Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 25234–25263. <https://doi.org/10.3390/ijms161025234>

Khalil, H. (2012). The effect of antioxidant supplements for preventing mortality in patients with various diseases. *Australian Pharmacist*, 31(5), 370. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007176.pub2>

Kumaraguruparan, R., Balachandran, C., Murali Manohar, B., & Nagini, S. (2005). Altered oxidant-antioxidant profile in canine mammary tumours. *Veterinary Research Communications*, 29(4), 287–296. <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000048499.38049.4b>

Machado, V. S., Crivellenti, L. Z., Bottari, N. B., Tonin, A. A., Pelinson, L. P., Borin-Crivellenti, S., Santana, A. E., Torbitz, V. D., Moresco, R. N., Duarte, T., Duarte, M. M. M. F., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M., Jaques, J. A., Tinucci-Costa, M., & Da Silva, A. S. (2015). Oxidative stress and inflammatory response biomarkers in dogs with mammary carcinoma. *Pathology Research and Practice*, 211(9), 677–681. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.06.011>

Macotpet, A., Suksawat, F., Sukon, P., Pimpakdee, K., Pattarapanwichien, E., Tangrassameeprasert, R., & Boonsiri, P. (2013). Oxidative stress in cancer-bearing dogs assessed by measuring serum malondialdehyde. *BMC Veterinary Research*, 9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-101>

Martarelli, D., Cocchioni, M., Scuri, S., & Pompei, P. (2011). Diaphragmatic breathing reduces exercise-induced oxidative stress. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, Epub 2011 Feb 10. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep169>

Martínez, M. E., Jacobs, E. T., Baron, J. A., Marshall, J. R., & Byers, T. (2012). Dietary supplements and cancer prevention: Balancing potential benefits against proven harms. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(10), 732–739. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs195>

Mastellone, V., Musco, N., Vassalotti, G., Piantedosi, D., Vastolo, A., Cutrignelli, M. I., Britti, D., Cortese, L., & Lombardi, P. (2020). A Nutritional Supplement (DiLsh™) Improves the Inflammatory Cytokines Response, Oxidative Stress Markers and Clinical Signs in Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*. *Animals*, 10(6), 938. <https://doi.org/10.3390/ani10060938>

Møller, P., Folkmann, J. K., Forchhammer, L., Bräuner, E. V., Danielsen, P. H., Risom, L., & Loft, S. (2008). Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. In *Cancer Letters* (Vol. 266, Issue 1, pp. 84–97). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.030>

Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>

Nakano, N., Nakao, A., Uchida, T., Shirasaka, N., Yoshizumi, H., Okumura, K., Tsuboi, R., & Ogawa, H. (2005). Effects of arachidonic acid analogs on FcεRI-mediated activation of mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1738(1–3), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.11.005>

Owen, L. (1980). TNM Classification of tumours in domestic animals. *World Health Organisation*, 1–52.

Palmieri, B., & Sblendorio, V. (2007a). Oxidative stress tests : overview on Part II. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 11, 383–399.

Palmieri, B., & Sblendorio, V. (2007b). Oxidative stress tests: Overview on reliability and use. Part II. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 11(6), 383–399.

Pasquini, A., Luchetti, E., & Cardini, G. (2010). Evaluation of oxidative stress in hunting dogs during exercise. *Research in Veterinary Science*, 89(1), 120–123. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.01.004>

Pasquini, A., Luchetti, E., Marchetti, V., Cardini, G., & Iorio, E. L. (2008). Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy Labrador dogs. *Veterinary Research Communications*, 32(2), 137–143. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-9014-x>

Pietraforte, D., & Straface, E. (2005). ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ Radicali liberi , stress ossidativo e salute Rapporti ISTISAN. *Free Radicals, Oxidative Stress and Health., Rapporti I*, 1-126 p.

Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>

Rhodes, C. J. (2017). Magnetic resonance spectroscopy. *Science Progress*, 100(3), 241–292. <https://doi.org/10.3184/003685017X14993478654307>

Elias Pirari, Valutazione di due differenti tipologie di stress in ambito oncologico veterinario, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

- Sayin, V. I., Ibrahim, M. X., Larsson, E., Nilsson, J. A., Lindahl, P., & Bergo, M. O. (2014). Cancer: Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Science Translational Medicine*, 6(221). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007653>
- Sechi, S., Chiavolelli, F., Spissu, N., Di Cerbo, A., Canello, S., Guidetti, G., Fiore, F., & Cocco, R. (2015). An Antioxidant Dietary Supplement Improves Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Serum of Aged Dogs: Preliminary Results. *Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/412501>
- Secretariat, E., Biology, F. R., Street, B., Davies, K. J. A., Augusto, O., Paulo, I. D. Q. D. S., Brigelius-flohe, R., Dennery, P. A., Mann, G., Roberts, L. J., Ames, B., & Valentine, J. S. (2014). Editorial Board. *Free Radical Biology and Medicine*, 76, IFC. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(14\)00463-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(14)00463-8)
- Szczubiał, M., Kankofer, M., Łopuszyński, W., Dąbrowski, R., & Lipko, J. (2004). Oxidative stress parameters in bitches with mammary gland tumours. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 51(7–8), 336–340. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00647.x>
- Trotti, R., Carratelli, M., & Barbieri, M. (2002). Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Medica*, 44(1), 37–40.
- Tsinkalovsky, O. R., & Laerum, O. D. (1994). Flow cytometric measurement of the production of reactive oxygen intermediates in activated rat mast cells. *APMIS*, 102(1–6), 474–480. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1994.tb04901.x>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 39, Issue 1, pp. 44–84). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vendemiale, G., Serviddio, G., Dagostino, M. P., & Romano, A. D. (2011). Stress ossidativo e invecchiamento cellulare. *Giornale Di Gerontologia*, 59(5), 261–264.
- Winter, J. L., Barber, L. G., Freeman, L., Griessmayr, P. C., Milbury, P. E., & Blumberg, J. B. (2009). *Antioxidant Status and Biomarkers of Oxidative Stress in Dogs with Lymphoma. I*, 311–316.
- Withrow, S. J., & MacEwan, E. G. (2001). Small animal clinical oncology. In *Small animal clinical*.



PSICONCOLOGIA: VALUTAZIONE DELL'IMPATTO PSICOLOGICO DELLA  
DIAGNOSI DI TUMORE NEL PROPRIO CANE SU UN GRUPPO DI PERSONE  
ATTRAVERSO L'USO DELL'"IMPACT OF EVENT SCALE-REVISED" (IES-R)

## INTRODUZIONE

Le interazioni tra l'uomo e il cane si stima risalga a circa 15.000-33.000 anni fa in Europa e Siberia orientale, quando l'uomo esercitava principalmente l'attività della caccia e della raccolta, mentre con la nascita dell'agricoltura, circa 10.000 anni fa, si è intensificata la selezione del cane come animale da compagnia, prediligendo una più piccola stazza e una maggiore docilità (Barker & Wolen, 2008) (Wayne & Vonholdt, 2012). La facilità della domesticazione del cane probabilmente dipende dalle sue abilità sociali e dalla sua capacità comunicativa attraverso posture e atteggiamenti, mimica facciale, segnali di tipo visivo e olfattivo, che gli permettono di comunicare con gli altri individui all'interno di un branco, ma anche con l'uomo (Serpell, 2016). Attualmente il cane è tra gli animali domestici maggiormente rappresentati nei nuclei familiari di tutto il mondo. Il numero di animali domestici si stima che sia in continuo aumento in molti paesi Europei. Uno studio eseguito dal CENSIS «Il valore sociale del medico veterinario» e pubblicato nell'Aprile 2019 afferma che l'Italia è il secondo paese per numero di animali domestici in Europa. Si stima che siano presenti circa 32 milioni di animali domestici dei quali circa 7,5 milioni sono gatti mentre altri 7 milioni sono cani.

Le persone che considerano il proprio animale domestico come membro della famiglia è sempre maggiore e spesso la loro figura è assimilata a quella dei bambini (Cohen, 2002). Molti proprietari si identificano come genitori dei loro cani o gatti, li fanno dormire sul letto con loro e gli fanno regali di Natale (Cohen, 2002).

Molte persone fanno dei sacrifici per il loro animale domestico proprio come farebbero per un familiare e nonostante alcune controindicazioni come ad esempio le allergie, molte persone tendono in ogni caso ad adottare un nuovo animale domestico dopo la morte del precedente (Cohen, 2002).

Avere un animale domestico comporta dei vantaggi, sia per le singole persone che per le coppie o le famiglie.

Spesso chi ha bambini in casa ha anche un animale domestico. I vantaggi di avere un animale da compagnia nel proprio nucleo familiare possono essere di tipo fisiologico e psicologico. Alcuni studi riportano un minore

tempo di riabilitazione a seguito di una malattia per le persone che hanno un animale domestico e altri studi (Elias Pirari, Valutazione di due differenti tipologie di stress in ambito oncologico veterinario, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari)

riportano invece un rischio inferiore di sviluppare talune malattie in presenza di un animale domestico in famiglia. Avere un cane può aiutare ad avere una maggiore e costante attività fisica, ma anche dal punto di vista psicosociale sono stati identificati dei vantaggi. Avere un animale domestico aiuta a ridurre lo stress, a migliorare l'assetto psicosociale del proprietario, riduce la solitudine per le persone che vivono da sole e riduce il rischio di sviluppare depressione. Per i bambini i vantaggi si traducono in una maggiore autonomia, maggiore autostima e maggiore sviluppo dell'empatia(Barker & Wolen, 2008).

Secondo alcuni studi, agli animali domestici viene anche riconosciuto un ruolo importante per quelle persone che soffrono di salute mentale(Brooks et al., 2018). La morte di un animale domestico può portare sofferenza nel proprietario o all'interno del nucleo familiare proprio come quando si perde un amico o un parente. Le reazioni maggiormente sperimentate sono la tristezza, il dolore, la depressione e in casi estremi tali reazioni sono causa di ospedalizzazione e la persona che le sperimenta necessita di supporto psichiatrico(Tzivian et al., 2015). L'entità delle reazioni emotive può essere condizionata dal tempo trascorso assieme al proprio animale, al quale è correlato il grado di attaccamento(Tzivian et al., 2015) e generalmente questo tempo si aggira attorno ai 10-15 anni. Il miglioramento della qualità della vita e dei trattamenti veterinari ha portato ad un allungamento della vita media dei cani e questo si associa ad un maggiore rischio di morte associato a malattie oncologiche, risultanti essere tra le principali cause di morte in cani anziani finanche la prima(V. J. Adams et al., 2010; Fleming et al., 2011; O'Neill et al., 2013; Proschowsky et al., 2003). Le maggiori aspettative dei proprietari di animali domestici riguardo una migliore assistenza medica veterinaria, assistenza compassionevole e comunicazione(Shaw & Lagoni, 2007) ha portato il medico veterinario a cercare di far fronte alla difficoltà nel dover migliorare la comunicazione di brutte notizie e nel capire e gestire le eventuali reazioni da parte del cliente(Shaw & Lagoni, 2007). La comunicazione di brutte notizie è un evento stressante sia per il veterinario che per il proprietario. Il veterinario può sperimentare disagio nel comunicare una diagnosi di malattia terminale o nel discutere della morte di un animale con i propri clienti (Bateman, 2007; Shaw & Lagoni, 2007). Lo stesso tipo di disagio viene sperimentato anche in medicina umana da medici e infermieri e pertanto non deve essere considerato un evento stressante solo per chi riceve le brutte notizie(Aein & Delaram, 2014; Lee & Yi, 2013; Mishelmovich et al., 2016) Nella medicina umana tali notizie vengono date sia al paziente sia ad uno o più membri della famiglia del paziente, il medico veterinario si interfaccia invece con il

cliente (proprietario dell'animale) che rappresenta la famiglia del paziente. In medicina umana il ruolo e le responsabilità della famiglia del malato, soprattutto in campo oncologico, hanno un ruolo importante nel supporto e nella cura del paziente e nell'affrontare i problemi sociali(Rao et al., 2016). Per tale motivo i membri della famiglia del malato possono sperimentare grandi difficoltà emotive e sociali, soprattutto chi viene identificato come principale “caregiver” del malato(Fladeboe et al., 2018; Hirooka et al., 2018; Long & Marsland, 2011; Shapiro, 1998). L'assunzione di responsabilità da parte del caregiver aumenta il rischio di sviluppare stress, ansia e depressione e tali disturbi possono permanere anche per mesi dopo la fine del loro compito assistenziale(Payne et al., 1999). Tali eventi sono ancora più frequenti quando si comunica la diagnosi di tumore ai genitori di un bambino(Sawyer et al., 2000). Lo stesso tipo di esperienze possono essere vissute dai proprietari di animali a seguito della diagnosi di tumore e attualmente vi è un solo studio che indaga gli effetti psicosociali in questo contesto, mettendo in evidenza un maggiore livello di ansia e depressione tra i proprietari di animali ai quali è stato diagnosticato un tumore(Nakano et al., 2019).

## **SCOPO DEL LAVORO**

Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare l'impatto stressante che la diagnosi di tumore su un cane può scatenare sul suo proprietario attraverso l'utilizzo della IES-R (Impact of Event Scale – Revised).

Il progetto è stato sviluppato grazie alla collaborazione di una figura specialistica in campo psicologico che potesse valutare in maniera professionale ed accurata le risposte date dai proprietari ad un questionario ad essi proposto.

## **MATERIALI E METODI**

### **Selezione del campione**

Ai proprietari dei pazienti oncologici afferenti all'Ospedale Didattico Veterinario dell'Università degli Studi di Sassari, è stato chiesto di compilare il questionario "Scala di impatto dell'evento-rivista" (IES-R) di Daniel S. Weiss e Charles R. Marmar 1996, che valuta una lista di sintomi e difficoltà che una persona può sperimentare a seguito di un evento traumatico. Nel presente studio viene considerato come evento traumatico per la persona la diagnosi di tumore nel proprio cane entro le due settimane precedenti la compilazione del questionario. Il questionario era indirizzato solo alle persone che hanno ricevuto la diagnosi di tumore con una prognosi infausta. Non tutti i clienti hanno accettato di compilare il questionario.

Per ciascun proprietario, le uniche informazioni richieste per la compilazione del questionario erano:

- età;
- sesso;
- ambito lavorativo.

### **Procedure**

L'Impact of Event Scale-Revised (IES-R) è una scala psicométrica standardizzata, composta da 22 "item", impiegata per indagare la presenza di una sintomatologia post-traumatica da stress. Questo strumento è composto da tre sottodimensioni (Intrusività o ri-esperienza, Iperarousal ed Evitamento). L'intervistato ha valutato ogni item su una scala da 0 (per niente) a 4 (estremamente), in base alla propria esperienza, rispetto

Elias Pirari, Valutazione di due differenti tipologie di stress in ambito oncologico veterinario, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

all'evento traumatico riferendosi alle ultime due settimane. La IES-R è una valutazione utile per quantificare le reazioni allo stress dopo differenti eventi traumatici, ed è risultata uno strumento prezioso per identificare soggetti che avrebbero necessità di un intervento specialistico (Horowitz et al., 1979).

Sulla base dello score ottenuto, tale questionario permette di valutare lo sviluppo di un disturbo post-traumatico da stress (PTSD). I sintomi base del PTSD possono essere raccolti in 3 gruppi fondamentali e identificati attraverso gli "items" facenti parte delle 3 sottodimensioni di valutazione:

- Intrusività (intrusione di esperienze traumatiche come ad es. flashback, incubi, allucinazioni, deliri, illusioni, stati di ansia o panico, freezing);
- Evitamento, insensibilità e distacco (ad es. evitamento di pensieri, emozioni, persone o situazioni legate all'evento traumatico, amnesia, anestesia emotiva, incapacità di godersi la vita o provare amore, isolamento ed evitamento, riluttanza a parlare dell'evento traumatico);
- Ipervigilanza o iperarousal (risposte di sobbalzo, ansia, paura e agitazione, irrequietezza, senso di allerta costante, irritabilità, ira, rabbia, crisi emotive, insonnia, problemi di concentrazione e attenzione).

Per la valutazione di una eventuale presenza di PTSD è stato seguito quanto riportato dalle linee guida per l'interpretazione del questionario IES-R, pertanto i partecipanti sono stati identificati come affetti da tale disturbo qualora:

- Avessero risposto ad almeno 3 items facenti parte della sottodimensione dell'evitamento con valore di intensità di 3 o 4;
- Avessero risposto almeno un item facente parte della sottodimensione dell'intrusività con valore di intensità di 3 o 4;
- Avessero risposto almeno due items facenti parte della sottodimensione dell'Iperarousal con valori di intensità di 3 o 4.

Tutti gli items nei quali è stato dato un valore di intensità 0, 1 o 2 non sono stati presi in considerazione per la diagnosi di PTSD.

## **STATISTICA**

La distribuzione delle variabili continue è stata valutata mediante il test di Shapiro-Wilk. Le variabili sono state espresse mediante media e deviazione standard (DS). Il confronto delle variabili continue tra i due gruppi è stato eseguito mediante test t-di Student. Le variabili categoriche sono state espresse mediante frequenza assoluta e frequenza relativa. Il confronto tra gruppi su variabili categoriche è stato eseguito mediante il test del chi quadro.

## RISULTATI

I soggetti che hanno portato a termine il questionario sono stati 21, di cui 12 donne e 9 uomini. L'età media delle persone che hanno compilato il questionario è di 47 anni. Il gruppo totale è stato suddiviso in due gruppi in base al sesso, alla fascia di età e all'occupazione lavorativa in "occupati" e "disoccupati". La media degli IES-R score dei partecipanti era di 42.7 (Tabella 1).

<b>Numero di partecipanti n</b>	21
<b>tot (100)</b>	
Età media (SD)	47 (12,5)
<b>Genere</b>	
Uomini n (%)	9 (43)
Donne n (%)	12 (57)
<b>Impiego lavorativo</b>	
Occupati n (%)	11 (52)
Disoccupati n (%)	10 (48)
<b>Categoria età</b>	
< 50 anni, n (%)	13 (62)
=/> 50 anni, n (%)	8 (38)
<b>IES-R score, media (SD)</b>	42.7 (18.3)

Tabella 7. Distribuzione del numero dei partecipanti e media IES-R score



La differenza di età tra il gruppo degli uomini e il gruppo delle donne non è significativa (Tabella 2):

VARIABILE	Uomini (n=9)	Donne (n=12)	p
Età, media (SD)	44(11)	49 (13)	0.4

Tabella 8 Differenza età media tra gli uomini e le donne che hanno compilato l'IES-R

Sulla base delle variabili Evitamento, Intrusività e Iperarousal, sono stati confrontati i gruppi di persone formati sulla base dell'età, del sesso e dell'impiego lavorativo. Il gruppo di persone aventi età inferiore a 50 anni presentavano un maggiore score riguardante i sintomi relativi alla sottodimensione Intrusività rispetto alle persone con età uguale o maggiore a 50 anni (Tabella 3); le donne hanno presentato un maggiore score riguardante i sintomi relativi alla sottodimensione Evitamento rispetto agli uomini (Tabella 4); non sono state evidenziate differenze di score relativi alle 3 sottodimensioni tra persone occupate e disoccupate dal punto di vista lavorativo (Tabella 5).

VARIABILE	< 50 anni (n=13)	=/> 50 anni (n=8)	P
EVITAMENTO, mediana (range)	3(1-7)	1 (0-4)	0.07
INTRUSIVITA, media (SD)	4.5 (2.2)	2.25 (1.8)	0.02*
IPERAROUSAL, media (SD)	3.1(2.2)	1.6 (2)	0.13

Tabella 9. Differenze di score Evitamento, Intrusività e Iperarousal tra le persone con meno di 50 anni e le persone aventi età pari o superiore a 50 anni (\* significatività statistica).

VARIABILE	Uomini (n=9)	Donne (n=12)	P
EVITAMENTO, media (SD)	1.3(0.9)	2.75 (1.8)	0.04*
INTRUSIVITA, media (SD)	3.4 (2.5)	3.8 (2.2)	0.7
IPERAROUSAL, media (SD)	2.1(2)	3 (2.3)	0.4

Tabella 4. Differenze di score Evitamento, Intrusività e Iperarousal tra uomini e donne (\* significatività statistica).

Elias Pirari, Valutazione di due differenti tipologie di stress in ambito oncologico veterinario, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

VARIABILE	Disoccupati (n=10)	Occupati (n=11)	P
EVITAMENTO, mediana (range)	2(0-4)	2 (1-4)	0.5
INTRUSIVITA, media (SD)	3.9 (2.6)	3.4 (2.2)	0.7
IPERAROUSAL, mediana (range)	1(0-6)	2 (0-7)	0.2

Tabella 5. Differenze di score Evitamento, Intrusività e Iperarousal tra occupati e disoccupati (\* significatività statistica).

Considerando come cut-off un punteggio totale IES-R di 33 le persone che hanno compilato il questionario sono state suddivise in due gruppi. Un punteggio inferiore a 33 indica l'assenza completa di sintomi da PTSD o la sola presenza di alcuni sintomi, mentre un punteggio uguale o superiore a 33 indica la probabile presenza di PTSD (Tabella 6).

	IES-R SCORE < 33	IES-R SCORE =/> 33
<b>N persone (%)</b>	7 (33)	14 (67)
<b>PTDS score, media</b>	23	67

Tabella 5 Media degli score totali tra i due gruppi di persone che possono essere considerate a rischio o meno di sviluppare PTSD in base al IES-R cut-off di 33.

Il confronto tra la media di IES-R score eseguito tra i tre principali gruppi di persone suddivise in base all'età, al sesso e all'occupazione lavorativa, mette in evidenza come vi sia una differenza significativa solo sulla base dell'età: le persone con una età inferiore ai 50 anni ha avuto uno score medio totale superiore rispetto al gruppo di persone aventi età uguale o maggiore di 50 anni (tabelle 6, 7, 8).

<b>VARIABILE</b>	<b>Uomini (n=9)</b>	<b>Donne (n=12)</b>	<b>p</b>
Score, media (SD)	39,5(14,5)	45 (21)	0.5

*Tabella 6 Differenza IES-R score totale medio tra uomini e donne*

<b>VARIABILE</b>	<b>Età &lt; 50 anni (n=13)</b>	<b>Età =/&gt; 50 anni (n=8)</b>	<b>p</b>
Score, media (SD)	49,4(17)	31.9 (15,9)	0.03

*Tabella 7 Differenza IES-R score totale medio tra persone con meno di 50 anni e aventi età pari o superiore a 50 anni*

<b>VARIABILE</b>	<b>Occupati (n=11)</b>	<b>Disoccupati (n=10)</b>	<b>p</b>
Score, media (SD)	43,5 (18,4)	42(19,2)	0.8

*Tabella 8 Differenza IES-R score totale medio tra occupati e disoccupati*

## **DISCUSSIONE**

Lo score dell'Impact of Event Scale-Revised (IES-R) è uno strumento utilizzato come indicatore di disturbo post-traumatico da stress (PTSD) e non uno strumento diagnostico. Viene pertanto utilizzato per valutare la risposta da parte del soggetto ad un evento traumatico specifico nelle due settimane successive all'evento stesso, ma può anche essere utilizzato per il monitoraggio della risposta adattiva del soggetto nel tempo (Christianson & Marren, 2012; Horowitz et al., 1979). Le scale IES e IES-R sono state utilizzate su diversi gruppi di persone e a seguito di molteplici eventi capaci di causare uno stress psicologico (Kragh et al., 2019), rendendolo uno strumento solido e versatile, nonché utile nell'identificare i sintomi di un probabile PTSD. La comunicazione di una diagnosi di tumore in medicina umana, è un evento stressante per tutta la famiglia e non solo per il malato. Dei genitori possono provare paura per il benessere e la sopravvivenza del bambino ammalato di tumore così come esprimono preoccupazioni e paure anche gli altri membri della famiglia come ad esempio i fratelli o le sorelle. Una tale diagnosi può portare ad uno sconvolgimento delle interazioni tra i componenti della famiglia (Long & Marsland, 2011). I disturbi manifestati dai familiari di una persona affetta da tumore sono principalmente ansia, depressione e disturbo post-traumatico da stress. Vengono anche identificati disturbi emotivi, sociali, comportamentali, cognitivi e fisici (Okamoto et al., 2012). Un altro importante fattore è il carico emotivo e il carico di responsabilità percepito dai familiari, soprattutto da parte del principale "caregiver". I sintomi del PTSD possono essere influenzati da diversi fattori come ad esempio aver sperimentato precedentemente un trauma o dalla mancanza di un'occupazione lavorativa (Masa'deh & Jarrah, 2017; Pöder et al., 2008; van Warmerdam et al., 2019). Il rapporto tra un cane e il suo proprietario si basa sull'attaccamento e lo stesso tipo di interazione si crea tra una madre e il proprio figlio (Mueller, 2014; Serpell, 2016; Topál et al., 1998). Uno studio dimostra come i livelli di ansia e depressione siano maggiori nei proprietari di animali ai quali sia stato diagnosticato un tumore. Probabilmente tali risultati sono influenzati dai lunghi periodi di assistenza di cui necessitano i loro animali, dai costi da sostenere, dall'onere di dover portare l'animale in clinica frequentemente, dalla preoccupazione scaturita dal progredire della malattia o dall'esacerbazione dei sintomi e del dolore ma anche dalla preoccupazione per la morte del loro animale (Nakano et al., 2019).

Nel nostro lavoro la diagnosi di tumore sul cane viene considerato “l’evento stressante” per il proprietario ed entro la seconda settimana dalla diagnosi è stato compilato l’IES-R, successivamente restituito presso l’Ospedale Didattico Veterinario.

Nel valutare la possibile presenza di un PTSD viene preso in considerazione lo score totale medio su tutti gli items, ma anche la presenza o assenza dei sintomi di Intrusività, Evitamento ed Iperarousal. Lo score medio totale di tutti i partecipanti era di 42.7, con un cut-off di 33, oltre il quale la probabilità che sia presente un PTSD aumenta in modo proporzionale allo score ottenuto. Il 67% delle persone ha ottenuto uno score superiore al cut-off, con uno score totale medio di 67, un valore per il quale la presenza di un PTSD è molto probabile. In generale si potrebbe affermare che la maggior parte delle persone che hanno ricevuto la diagnosi di tumore nel proprio cane manifestano una risposta adattiva alterata. Tra le persone oggetto di studio, vi è una differenza significativa di score totale medio tra i gruppi formati in base all’età. Le persone che hanno meno di 50 anni hanno ottenuto uno score maggiore rispetto a chi ha una età superiore ai 50 anni. È possibile che questo derivi dal bagaglio esperienziale proprio di ciascun individuo. Chi ha una età maggiore potrebbe aver già vissuto simili esperienze con un altro cane in precedenza o esperienze simili riguardanti dei familiari. Potrebbe trovarsi in una situazione lavorativa più stabile, oppure potrebbe avere maggiore disponibilità di tempo da poter dedicare al suo animale.

Non sono invece state evidenziate differenze tra la media dello score totale tra uomini e donne e tra persone aventi un lavoro o disoccupate.

Nella valutazione dello score totale delle tre sottodimensioni relative ai sintomi di Intrusività, Evitamento e Iperarousal, si osserva che le persone aventi meno di 50 anni di età sperimentano maggiori sintomi correlati all’intrusività rispetto alle persone con età uguale o superiore a 50 anni, mentre le donne hanno sperimentato maggiori sintomi relativi all’Evitamento rispetto agli uomini.

Con questo lavoro non è stata eseguita nessuna diagnosi di PTSD ma lo studio voleva osservare eventuali fattori predittivi di tale disturbo al fine di supportare la tesi secondo la quale il proprietario di un animale domestico risponde psicologicamente ad una diagnosi di tumore come quando la diagnosi viene emessa per un membro della famiglia (C. L. Adams et al., 1999; Walsh, 2009b, 2009a).

Considerare la possibilità che i proprietari di animali domestici affetti da tumore possano sperimentare disturbi psicosociali può essere di grande utilità per chi si occupa della salute mentale delle persone. Allo stesso modo, conoscere l'impatto che può avere sui proprietari di animali domestici la diagnosi di tumore, può essere utile anche ai medici veterinari, al fine di prestare maggiore attenzione nel dare una cattiva notizia. In medicina umana vengono utilizzati specifici protocolli per comunicare una brutta notizia in campo medico (Baile et al., 2000) e sempre più largamente vengono utilizzati anche in medicina veterinaria (Preface et al., 2007), probabilmente per via del fatto che, anche il tipo di comunicazione può essere un fattore influenzante l'impatto che la notizia possa avere sul proprietario del paziente (Shaw & Lagoni, 2007).

I limiti di questo lavoro sono rappresentati da risultati al momento ancora poco numerosi per trarre delle conclusioni, inoltre non è possibile generalizzare tali eventi per via del fatto che lo studio è stato condotto solo su persone che si sono rivolte presso un centro medico veterinario di riferimento. Non è stato possibile indagare su eventuali problemi psicologici o sociali concomitanti sulle persone che hanno compilato il questionario. Non è stato possibile ottenere una diagnosi certa di un PTSD ma solo l'indicazione di un probabile disturbo da stress non ulteriormente indagato a lungo termine. Il numero di soggetti coinvolti risulta ridotto e per ottenere maggiori informazioni e aumentare le variabili che possono influire sulla valutazione dello stato psicologico delle persone, sarebbe necessario eseguire l'indagine su una maggiore casistica.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams, C. L., Bonnett, B. N., & Meek, A. H. (1999). Owner response to companion animal death: Development of a theory and practical implications. *Canadian Veterinary Journal*, *40*(1), 33–39.
- Adams, V. J., Evans, K. M., Sampson, J., & Wood, J. L. N. (2010). Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, *51*(10), 512–524. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.00974.x>
- Aein, F., & Delaram, M. (2014). Giving bad news: A qualitative research exploration. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, *16*(6). <https://doi.org/10.5812/ircmj.8197>
- Baile, W. F., Buckman, R., Lenzi, R., Glober, G., Beale, E. A., & Kudelka, A. P. (2000). SPIKES—A Six-Step Protocol for Delivering Bad News: Application to the Patient with Cancer. *The Oncologist*, *5*(4), 302–311. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-4-302>
- Barker, S. B., & Wolen, A. R. (2008). The benefits of human-companion animal interaction: A review. *Journal of Veterinary Medical Education*, *35*(4), 487–495. <https://doi.org/10.3138/jvme.35.4.487>
- Bateman, S. W. (2007). Communication in the Veterinary Emergency Setting. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, *37*(1), 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.09.005>
- Brooks, H. L., Rushton, K., Lovell, K., Bee, P., Walker, L., Grant, L., & Rogers, A. (2018). The power of support from companion animals for people living with mental health problems: A systematic review and narrative synthesis of the evidence. *BMC Psychiatry*, *18*(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12888-018-1613-2>
- Christianson, S., & Marren, J. (2012). The Impact of Event Scale - Revised (IES-R). *Medsurg Nursing : Official Journal of the Academy of Medical-Surgical Nurses*, *21*(5), 321–322.
- Cohen, S. P. (2002). Can pets function as family members? *Western Journal of Nursing Research*, *24*(6), 621–638. <https://doi.org/10.1177/019394502320555386>
- Fladeboe, K., King, K., Kawamura, J., Gurtovenko, K., Stettler, N., Compas, B., Friedman, D., Lengua, L., Breiger, D., & Katz, L. F. (2018). Featured article: Caregiver perceptions of stress and sibling conflict during pediatric cancer treatment. *Journal of Pediatric Psychology*, *43*(6), 588–598. <https://doi.org/10.1093/jpepsy/psy008>
- Fleming, J. M., Creevy, K. E., & Promislow, D. E. L. (2011). Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related Causes of Death. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *25*(2), 187–198. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0695.x>
- Hirooka, K., Fukahori, H., Taku, K., Togari, T., & Ogawa, A. (2018). Examining Posttraumatic Growth Among Bereaved Family Members of Patients With Cancer Who Received Palliative Care at Home. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*, *35*(2), 211–217. <https://doi.org/10.1177/1049909117703358>
- Horowitz, M., Wilner, N., & Alvarez, W. (1979). Impact of event scale: A measure of subjective stress. *Psychosomatic Medicine*, *41*(3), 209–218. <https://doi.org/10.1097/00006842-197905000-00004>
- Kragh, A. R., Folke, F., Andelius, L., Ries, E. S., Rasmussen, R. V., & Hansen, C. M. (2019). Evaluation of tools to assess psychological distress: How to measure psychological stress reactions in citizen responders- a systematic review. In *BMC Emergency Medicine* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12873-019-0278-6>
- Lee, H. R., & Yi, S. Y. (2013). Delivering bad news to a patient: a survey of residents and fellows on attitude and awareness. *Korean Journal of Medical Education*, *25*(4), 317–325. <https://doi.org/10.3946/kjme.2013.25.4.317>
- Long, K. A., & Marsland, A. L. (2011). Family adjustment to childhood cancer: a systematic review. *Clinical Child and Family Psychology Review*, *14*(1), 57–88. <https://doi.org/10.1007/s10567-010-0082-z>
- Masa'deh, R., & Jarrah, S. (2017). Post Traumatic Stress Disorder in Parents of Children With Cancer in Jordan. *Archives of Psychiatric Nursing*, *31*(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.apnu.2016.07.012>
- Elias Pirari, Valutazione di due differenti tipologie di stress in ambito oncologico veterinario, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

- Mishelmovich, N., Arber, A., & Odelius, A. (2016). Breaking significant news: The experience of clinical nurse specialists in cancer and palliative care. *European Journal of Oncology Nursing*, *21*, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.ejon.2015.09.006>
- Mueller, M. K. (2014). The relationship between types of human–animal interaction and attitudes about animals: An exploratory study. *Anthrozoos*, *27*(2), 295–308. <https://doi.org/10.2752/175303714X13903827487728>
- Nakano, Y., Matsushima, M., Nakamori, A., Hiroma, J., Matsuo, E., Wakabayashi, H., Yoshida, S., Ichikawa, H., Kaneko, M., Mutai, R., Sugiyama, Y., Yoshida, E., & Kobayashi, T. (2019). Depression and anxiety in pet owners after a diagnosis of cancer in their pets: A cross-sectional study in Japan. *BMJ Open*, *9*(2), 1–8. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-024512>
- O’Neill, D. G., Church, D. B., McGreevy, P. D., Thomson, P. C., & Brodbelt, D. C. (2013). Longevity and mortality of owned dogs in England. *Veterinary Journal*, *198*(3), 638–643. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.09.020>
- Okamoto, I., Wright, D., & Foster, C. (2012). Impact of cancer on everyday life: A systematic appraisal of the research evidence. *Health Expectations*, *15*(1), 97–111. <https://doi.org/10.1111/j.1369-7625.2011.00662.x>
- Payne, S., Smith, P., & Dean, S. (1999). Identifying the concerns of informal carers in palliative care. *Palliative Medicine*, *13*(1), 37–44. <https://doi.org/10.1191/026921699673763725>
- Pöder, U., Ljungman, G., & von Essen, L. (2008). Posttraumatic stress disorder among parents of children on cancer treatment: A longitudinal study. *Psycho-Oncology*, *17*(5), 430–437. <https://doi.org/10.1002/pon.1263>
- Preface, C. A. K., Cornell, K. K., Brandt, J. C., Bonvicini, K. A., Adams, C. L., Frankel, R. M., Kopcha, M., Shaw, J. R., & Lagoni, L. (2007). Effective Communication in Veterinary Practice Erratum xiii Client-Veterinarian Communication: Skills for Client Centered Dialogue and Shared Decision Making 37. *Contents*, *37*(1).
- Proschowsky, H. F., Rugbjerg, H., & Ersbøll, A. K. (2003). Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. *Preventive Veterinary Medicine*, *58*(1–2), 63–74. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00010-2)
- Rao, A., Sunil, B., Ekstrand, M., Heylen, E., Raju, G., & Shet, A. (2016). Breaking bad news: Patient preferences and the role of family members when delivering a cancer diagnosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *17*(4), 1779–1784. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.4.1779>
- Sawyer, M., Antoniou, G., Toogood, I., Rice, M., & Baghurst, P. (2000). Childhood Cancer: A 4-Year Prospective Study of the Psychological Adjustment of Children and Parents. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, *22*(3), 214–220. <https://doi.org/10.1097/00043426-200005000-00006>
- Serpell, J. (2016). The domestic dog: Its Evolution, Behavior and Interactions with People: Second Edition. In *The Domestic Dog: Its Evolution, Behavior and Interactions with People: Second Edition*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781139161800>
- Shapiro, J. (1998). The importance of family functioning to caregiver adaptation in mothers of child cancer patients: testing a social ecological model. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, *15*(1), 47–54. <https://doi.org/10.1177/104345429801500107>
- Shaw, J. R., & Lagoni, L. (2007). End-of-Life Communication in Veterinary Medicine: Delivering Bad News and Euthanasia Decision Making. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, *37*(1), 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.09.010>
- Topál, J., Miklósi, Á., Csányi, V., & Dóka, A. (1998). Attachment Behavior in Dogs (*Canis familiaris*): A New Application of Ainsworth’s (1969) Strange Situation Test. *Journal of Comparative Psychology*, *112*(3), 219–229. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.112.3.219>
- Tzivian, L., Frigera, M., & Kushnir, T. (2015). Associations between stress and quality of life: Differences between owners keeping a living dog or losing a dog by euthanasia. *PLoS ONE*, *10*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121081>
- van Warmerdam, J., Zabih, V., Kurdyak, P., Sutradhar, R., Nathan, P. C., & Gupta, S. (2019). Prevalence of anxiety, depression, and posttraumatic stress disorder in parents of children with cancer: A meta-analysis. *Pediatric Blood and Cancer*, *66*(6). <https://doi.org/10.1002/psc.27677>
- Walsh, F. (2009a). Human-animal bonds I: The relational significance of companion animals. *Family Process*, *48*(4), 462–480. <https://doi.org/10.1111/j.1545-5300.2009.01296.x>
- Walsh, F. (2009b). Human-animal bonds II: The role of pets in family systems and family therapy. *Family Process*, *48*(4), 481–499. <https://doi.org/10.1111/j.1545-5300.2009.01297.x>



Wayne, R. K., & Vonholdt, B. M. (2012). Evolutionary genomics of dog domestication. In *Mammalian Genome* (Vol. 23, Issues 1–2, pp. 3–18). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9386-7>