



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento scienze Medico-Veterinarie,
Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in medicina
Veterinaria

L'USO DELLA LINFANGIOGRAFIA INDIRETTA E DEL BLU DI
METILENE NELLA RICERCA DEL LINFONODO SENTINELLA NEL
MASTOCITOMA CANINO

USE OF INDIRECT LYMPHANGIOGRAPHY AND METHYLENE BLUE DYE IN
SENTINEL LYMPH NODE MAPPING IN CANINE MAST CELL TUMOR

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Marina Martano

Correlatrice:

Dott.ssa Marzia Cino

Laureando:

Serena Galaverna

Anno Accademico 2022-2023

1	RIASSUNTO.....	1
2	ABSTRACT	2
3	PARTE GENERALE.....	3
3.1	EZIOPATOGENESI.....	3
3.2	EPIDEMIOLOGIA.....	5
3.3	COMPORAMENTO BIOLOGICO	8
3.4	PRESENTAZIONE CLINICA	11
3.5	STAGING CLINICO.....	13
3.5.1	<i>Citologia del mastocitoma</i>	<i>13</i>
3.5.2	<i>Individuazione clinica linfonodo regionale e citologia linfonodale</i>	<i>17</i>
3.5.3	<i>Ricerca metastasi a distanza e citologia fegato e milza</i>	<i>19</i>
3.5.4	<i>Assegnazione stadio clinico.....</i>	<i>21</i>
3.5.5	<i>Linfonodo sentinella</i>	<i>23</i>
3.5.6	<i>Ricerca del linfonodo sentinella e metodiche</i>	<i>25</i>
3.6	TRATTAMENTO CHIRURGICO	30
3.6.1	<i>Tecnica chirurgica</i>	<i>31</i>
3.6.2	<i>Recidiva e margini chirurgici</i>	<i>32</i>
3.6.3	<i>Linfadenectomia</i>	<i>33</i>
3.7	ISTOLOGIA DEL MASTOCITOMA	33
3.7.1	<i>Immunoistochimica.....</i>	<i>39</i>
3.7.2	<i>Indagini molecolari</i>	<i>41</i>
3.8	ISTOLOGIA LINFONODALE	42
3.9	TERAPIA MEDICA.....	43
3.9.1	<i>Chemioterapia</i>	<i>43</i>
3.9.2	<i>Radioterapia</i>	<i>45</i>
3.9.3	<i>Terapia di supporto</i>	<i>46</i>
3.9.4	<i>Elettrochemioterapia</i>	<i>47</i>
3.10	PROGNOSI E OUTCOME	48
4	PARTE SPECIALE.....	49
4.1	MATERIALI E METODI	50
4.1.1	<i>Linfangiografia indiretta</i>	<i>51</i>
4.1.2	<i>Chirurgia</i>	<i>52</i>
4.1.3	<i>Analisi dati</i>	<i>53</i>
4.2	RISULTATI.....	53
5	DISCUSSIONE.....	60
6	BIBLIOGRAFIA.....	67

1 RIASSUNTO

Il mastocitoma è un tumore maligno, di frequente riscontro nella specie canina, soprattutto nella forma cutanea, con comportamento biologico estremamente variabile. Metastatizza primariamente ai linfonodi. Il linfonodo sentinella (SLN) è la prima sede di drenaggio del tumore, che nel 22-80% dei casi non corrisponde al linfonodo regionale. La ricerca dei linfonodi sentinella (SLNs) è fondamentale per individuare le eventuali metastasi a quel livello. Tra le varie tecniche di mapping, la linfangiografia indiretta con tomografia computerizzata e la linfangiografia con blu di metilene sono le maggiormente utilizzate e le più accessibili nella pratica veterinaria.

L'obiettivo principale del presente studio è quello di valutare la percentuale di linfonodi sentinella individuati tramite linfangiografia indiretta preoperatoria con tomografia computerizzata (ICTL) e blu di metilene (MB) intraoperatorio. Il secondo obiettivo è di identificare la concordanza tra linfonodo sentinella (SLN) e regionale (RLN) identificati rispettivamente con ICTL e MB e la concordanza tra le due metodiche. Si ipotizza che nel 50% dei casi i linfonodi sentinella e regionali differiscano completamente tra loro, e che le tecniche di mapping preoperatoria e intraoperatoria siano sovrapponibili nell'identificazione di tali linfonodi. Sono stati inclusi 20 cani con 27 mastocitomi diagnosticati citologicamente e tutti sottoposti a ICTL e MB intraoperatorio. Dei soggetti in studio, sono stati rimossi neoformazione, linfonodi sentinella e linfonodi regionali (RLN), e analizzati tutti istologicamente. L'assenza di corrispondenza tra RLN e SLN è presente nel 25% dei casi, mentre è parziale (ovvero uno dei linfonodi sentinella identificati corrispondeva al regionale) nel 58,3% dei casi. È invece completa nel 16,7% dei casi. Sulla base di questi risultati, la ricerca del SLN acquisisce grande importanza data l'elevata percentuale di non corrispondenza tra SLN e RLN. Inoltre, la linfangiografia con MB intraoperatoria non è sempre d'aiuto per la ricerca intraoperatoria del SLN, pertanto il suo utilizzo va valutato caso per caso.

2 ABSTRACT

Mast cell tumors are a common malignant tumor in dogs, particularly in the cutaneous form, with extremely variable biological behavior. It metastasizes primarily to the lymph nodes. The sentinel lymph node (SLN) is the first site of tumor drainage, which in 22-80% of cases does not correspond to the regional lymph node (RLN). The search for sentinel lymph nodes (SLNs) is essential to identify any metastases at that level. Among the various mapping techniques, indirect lymphangiography with computed tomography and lymphangiography with methylene blue are the most commonly used and accessible.

The main objective of this study is to evaluate the percentage of sentinel lymph nodes identified by preoperative indirect lymphangiography with computed tomography (ICTL) and intraoperative methylene blue (MB). The second objective is to identify the concordance between sentinel (SLN) and regional (RLN) lymph node identified by ICTL and MB and the concordance between the two methods. It is hypothesized that in 50% of cases the sentinel lymph nodes and regional lymph nodes differ completely from each other, and that the preoperative and intraoperative mapping techniques are overlapping in the identification of such lymph nodes.

Twenty with 27 mast cell tumors cytological diagnosed as mast cell tumors were included and all underwent ICTL and MB. In the study subject, the neoplasm, sentinel lymph nodes and regional lymph nodes, if necessary, were removed and analyzed histologically. The absence of correspondence between RLN and SLN is present in 25% of cases it is partial in 58,3%. Is complete in 16,7%. Based on these results, the search for the SLN is of great importance given the high percentage of non-correspondence between SLN and RLN. Furthermore, methylene blue lymphangiography is not entirely overlapping with ICTL as a methodology for intraoperative search for the SLN.

3 PARTE GENERALE

Il mastocitoma (MCT) è un tumore maligno caratterizzato da una proliferazione incontrollata di mastociti neoplastici, di frequente riscontro nella specie canina, soprattutto al livello cutaneo e sottocutaneo (Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Şmiech et al. 2018; London & Thamm 2020; Willmann et al. 2021).

Il MCT può avere un comportamento biologico che varia da poco aggressivo, per tanto la terapia chirurgica è solitamente curativa, ad estrema parte maligno, a crescita rapida, e può dare metastasi diffondendo primariamente ai linfonodi, e successivamente per via ematica a milza, fegato e altri organi a distanza; di conseguenza anche la prognosi dei cani con MCT è variabile (Misdorp 2004; Murphy et al. 2006; Welle et al. 2008; Kiupel et al. 2011; MacNeill 2011; Blackwood et al. 2012; Sabattini et al. 2015; Camus et al. 2016; Śmiech et al. 2017; Horta et al. 2018; Kiupel & Camus 2019; London & Thamm 2020; Berlato et al. 2021; Martins et al. 2021; Willmann et al. 2021; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022a; Ribeiro et al. 2022).

3.1 EZIOPATOGENESI

I mastociti sono cellule ematiche di derivazione midollare, che si differenziano in mastociti maturi a livello tissutale in presenza del fattore di crescita delle cellule staminali (SCF) e di altre citochine, (Kiupel et al. 2004; Welle et al. 2008; London & Thamm 2020). All'interno del loro citoplasma sono presenti granuli contenenti enzimi proteolitici, come triptasi e chimasi, espressi in percentuale variabile in base al microambiente in cui maturano i mastociti, eparina, istamina, metaboliti dell'acido arachidonico, citochine (TNF- α e IL-6), fattori di crescita (VEGF e BFGF), mediatori lipidici (PGD₂ e LTC₄), e fattori chemiotattici eosinofili. In caso di degranolazione, tali sostanze vengono rilasciate nei tessuti circostanti (Kiupel et al. 2004; Misdorp 2004; Welle et al. 2008; London & Thamm 2020). I mastociti partecipano attivamente a diversi meccanismi biologici, quali la risposta infiammatoria, quella immunologica innata e nelle risposte allergiche (Misdorp 2004; Welle et al. 2008; London & Thamm 2020).

La degranolazione può essere causata da diversi fattori, tra i quali trauma, calore, tossine, manipolazione con conseguente sintomatologia sistemica e/o locale (Welle et al. 2008; London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022).

L'etiologia del mastocitoma non è ancora del tutto compresa ma con molta probabilità è multifattoriale (Miller 1995; Welle et al. 2008; White et al. 2011; Blackwood et al. 2012; Śmiech et al. 2017; London & Thamm 2020; Martins et al. 2021; De Nardi et al. 2022; Ribeiro et al. 2022). L'ipotesi più accreditata sembra essere di tipo genetico e questo spiegherebbe la maggiore predisposizione di alcune razze rispetto ad altre. Studi genetici hanno riscontrato nel 10-45% dei MCT una mutazione del gene c-kit (Welle et al. 2008; Shoop et al. 2015; Oliveira et al. 2020), nel 17,3% una mutazione del gene GNB1 associata per lo più a prognosi positiva, nel 14,6% una mutazione del gene onco-soppressore TP53 (anche se non dimostrato come affidabile marcatore prognostico) e concomitante alterazione della proteina che codifica. Inoltre, sono state rilevate alterazioni nell'espressione delle proteine inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti p21 e p27. Tra i fattori predisponenti vi sono infiammazioni croniche cutanee, irritazione meccanica (ad esempio nelle regioni ascellare e inguinale), esposizione a composti irritanti e immunodeficienza (Miller 1995; Webster et al. 2007; Welle et al. 2008; Śmiech et al. 2017; Cruz et al. 2020; London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022; Ribeiro et al. 2022).

L'anomalia molecolare maggiormente descritta (15-40% dei cani affetti da mastocitoma cutaneo (Welle *et al.* 2008) riguarda la proteina KIT o CD-117 recettore tirosin chinasi transmembranario di tipo III, il quale lega i fattori di crescita delle cellule staminali SCF che promuovono sviluppo, proliferazione, differenziazione e maturazione delle cellule che lo esprimono, tra cui i mastociti. Questo recettore è codificato dal gene c-KIT, il quale mutando promuove la sopravvivenza e la proliferazione neoplastica incontrollata dei mastociti anche in assenza del legame col fattore di crescita. Data la correlazione con sviluppo e progressione del mastocitoma, il gene c-KIT può essere utilizzato come marker di mastocitomi poco o non differenziati in cui sembra essere over-espresso (Downing et al. 2002; Kiupel et al. 2004; Misdorp 2004; Preziosi et al. 2004; Webster et al. 2007; Welle et al. 2008; Thompson et al. 2011; London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022; Tamlin et al. 2022; Willmann et al. 2021). La proteina KIT è presente in mastociti non tumorali e tumorali, soprattutto in quelli meno differenziati, dove le mutazioni del suo proto-oncogene portano ad una alterata regolazione e ad una sovra espressione di tale proteina, contribuendo allo sviluppo della neoplasia (Marconato *et al.* 2022b). Le mutazioni riguardanti delezione o duplicazione relative al dominio juxtamembranario della proteina KIT sono state rilevate nel 13,6-30% dei mastocitomi si considerano associate a maggiore aggressività, a tempi di sopravvivenza ridotti ed all'aumento del rischio di recidiva e metastasi. Una duplicazione rilevante di c-KIT è associata alla fosforilazione e

alla dimerizzazione della proteina KIT, con conseguente alterazione nella funzione della proteina stessa ed è indicativa di una scarsa prognosi (Misdorp 2004; Preziosi et al. 2004; Welle et al. 2008; London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022; Tamlin et al. 2022).

Le mutazioni più frequenti rilevate a carico del proto-oncogene c-kit nel mastocitoma canino sono a livello di esoni 8 e 9 (anche se meno rilevanti), 12 e 11, quest'ultima si verifica nel 18-33% dei casi ed è soprattutto associato a mastocitomi di medio-alto grado e a maggior rischio di recidiva locale, metastasi e decesso (Downing et al. 2002; Misdorp 2004; Preziosi et al. 2004; Welle et al. 2008; Horta et al. 2018; London & Thamm 2020; Willmann et al. 2021; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022b, 2022a; Tamlin et al. 2022).

L'espressione del fattore di crescita angiogenico (VEGF) risulta associata a ridotto tempo libero da malattia. Le proteine prodotte in risposta allo stress sono ritrovate in abbondanza nei mastocitomi di grado elevato, e risultano correlate con lo sviluppo di metastasi e con la mortalità cellulare (London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022).

Non esistono prove di eziologia virale, di correlazioni con applicazioni di agenti cancerogeni topici o di trasmissione orizzontale, nonostante sperimentalmente sia stato possibile il trapianto di tessuto tumorale in cani molto giovani o immunocompromessi (Misdorp 2004; Welle et al. 2008; London & Thamm 2020).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

Il mastocitoma è la seconda neoplasia più diagnosticata nel cane e la prima a livello cutaneo (16-21%) (Patnaik et al. 1984; Kosanovich Cahalane et al. 2004; Misdorp 2004; Romansik et al. 2007; Krick et al. 2009; Book et al. 2011; Kiupel et al. 2011; White et al. 2011; Blackwood et al. 2012; Warland & Dobson 2013; Warland et al. 2014; Sabattini et al. 2015; Camus et al. 2016; Hergt et al. 2016; Scarpa et al. 2016; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Śmiech et al. 2017; Horta et al. 2018; Śmiech et al. 2018; Kiupel & Camus 2019; Śmiech et al. 2019; Gill et al. 2020; London & Thamm 2020; Oliveira et al. 2020; Pecceu et al. 2020; Berlatto et al. 2021; Martins et al. 2021; Willmann et al. 2021; De Bonis et al. 2022; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022; Paes et al. 2022; Ribeiro et al. 2022; Rinaldi et al. 2022).

Le razze in cui si riscontra più sovente lo sviluppo dei MCT sono, oltre quella meticcia (26,23-30%): Boxer (14-28,14%) soprattutto giovani, Labrador Retriever (7,6-27,46% (Martins *et al.* 2021)), American Staffordshire Terrier (5,32-5,82%), Golden Retriever (4,10-4,55%), Bulldog Francese (1,52-3,28%), Bassotto Tedesco (2,55-2,66%), Bovaro del Bernese (1,9-2,73%), Pitt bull (2,87%), Schnauzer (10%, anche se studi più recenti dimostrano un rischio minore 0,91-1,9% (Śmiech *et al.* 2019, 2017)), Barboncino (7%) Shar-Pei (2,55-9,9%), Carlino (0,55-2,05%); sono riportate altre razze con minor rischio di sviluppare mastocitoma: Pastore Tedesco (1,64%), Beagle (1,23%), Bull Terrier Inglese (0,91-1,23%) (Patnaik *et al.* 1984; Kosanovich Cahalane *et al.* 2004; Misdorp 2004; Welle *et al.* 2008; White *et al.* 2011; Blackwood *et al.* 2012; Warland & Dobson 2013; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Śmiech *et al.* 2017; Śmiech *et al.* 2018; Śmiech *et al.* 2019; London & Thamm 2020; Oliveira *et al.* 2020; Martins *et al.* 2021; De Nardi *et al.* 2022; Rinaldi *et al.* 2022).

Tali percentuali possono variare in base all'area geografica. Ad esempio, in Europa la razza Boxer è la maggiormente rappresentata, seguita da Shar-Pei, American Staffordshire Terrier, Golden Retriever, Labrador Retriever e Bulldog Francese, mentre in America sono riportate come razze con maggior rischio di sviluppo di mastocitoma Boxer, Boston Terrier, Labrador Retriever, Vizsla, Rhodesian Ridgeback, Boston Terriers, Weimaraner e Shar-Pei (Villamil *et al.* 2011; Warland & Dobson 2013; Śmiech *et al.* 2018; Śmiech *et al.* 2019; Martins *et al.* 2021).

Ovviamente l'incidenza è influenzata anche dalla diffusione di queste razze nei diversi Stati (Warland & Dobson 2013; Rinaldi *et al.* 2022). È comunque evidente come nonostante le differenze geografiche la razza più colpita sia il Boxer (Śmiech *et al.* 2018; Śmiech *et al.* 2019; Rinaldi *et al.* 2022). Tuttavia, tutte le razze e i cani meticci possono comunque sviluppare mastocitoma; infatti, i meticci sono la categoria maggiormente rappresentata per numerosità ma con una predisposizione 10 volte minore rispetto al Boxer di sviluppare mastocitoma (Kosanovich Cahalane *et al.* 2004; Misdorp 2004; London & Thamm 2020; Oliveira *et al.* 2020; Rinaldi *et al.* 2022).

La razza Boxer insieme ad altre razze di origine Bulldog e Labrador Retriever sono predisposte allo sviluppo di mastocitomi di basso grado, ben differenziati, con prognosi solitamente favorevole e alto tasso di sopravvivenza; al contrario, razze che sviluppano frequentemente mastocitomi più aggressivi sono: Shar-Pei, Weimaraner, American Staffordshire Terrier e Pitt Bull (Miller 1995; Welle *et al.* 2008; Blackwood *et al.* 2012; Śmiech *et al.* 2017; Śmiech *et al.* 2018; Śmiech *et al.* 2019; London & Thamm 2020; Martins *et al.* 2021; De Nardi *et al.* 2022; Marconato *et al.* 2022a;).

Da alcuni studi è emersa una correlazione tra taglia e grado istologico. Ne è risultato che cani di piccola taglia sono predisposti allo sviluppo di mastocitomi di alto grado, cani di media taglia a mastocitomi di grado intermedio e mastocitomi intestinali, mentre per i cani di taglia grande non sono dimostrate correlazioni (Misdorp 2004; Śmiech *et al.* 2017). Inoltre, è riportato un doppio rischio nelle razze grandi rispetto a quelle di taglia piccola di sviluppare mastocitoma, e nelle razze giganti il rischio cinque volte maggiore rispetto alle razze piccole, nonostante le razze giganti siano comunque poco rappresentate (White *et al.* 2011). Tuttavia, tale evidenza non è smentita da altri studi (Śmiech *et al.* 2017).

L'età media di sviluppo dei MCT è 9 anni (7,5-10,5) (Patnaik *et al.* 1984; Kosanovich Cahalane *et al.* 2004; Camus *et al.* 2016; Blackwood *et al.* 2012; Śmiech *et al.* 2018; Şmiech *et al.* 2019; London & Thamm 2020; Oliveira *et al.* 2020; Martins *et al.* 2021; De Nardi *et al.* 2022; Marconato *et al.* 2022a).

È riportato lo sviluppo di mastocitomi di basso grado in animali più giovani (età media 4-10 anni), mentre quelli di grado più alto sono di maggior riscontro in cani anziani (11-18 anni)(Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Şmiech *et al.* 2018; Martins *et al.* 2021; Marconato *et al.* 2022b).

I dati riguardanti la predisposizione del sesso risultano contrastanti. Alcuni studi identificano lo sviluppo di mastocitomi più aggressivi nei maschi (58,17%) rispetto alle femmine (41,83%) (Şmiech *et al.* 2018; Śmiech *et al.* 2017). Altri autori riportano la sterilizzazione come fattore predisponente (Kosanovich Cahalane *et al.* 2004; White *et al.* 2011; Mochizuki *et al.* 2017; Śmiech *et al.* 2017; Martins *et al.* 2021). Nonostante questo, la maggioranza degli studi riporta equivalenti frequenze di riscontro tra maschi e femmine (Welle *et al.* 2008; Shoop *et al.* 2015; Śmiech *et al.* 2017; Kiupel & Camus 2019; Śmiech *et al.* 2019; London & Thamm 2020; Martins *et al.* 2021; De Nardi *et al.* 2022). Pertanto, il sesso non viene considerato un fattore predisponente.

3.3 COMPORTAMENTO BIOLOGICO

Il mastocitoma ha un comportamento biologico estremamente variabile e difficilmente prevedibile. Viene classificato in due macrocategorie: scarsamente maligno, che può persistere per lungo tempo senza dare metastasi, in forma singola o multipla, di piccole dimensioni, non ulcerato ma possibilmente alopecico e per il quale la terapia chirurgica è curativa, e estremamente maligno, solitamente ulcerato, circondato da tessuto infiammato ed edematoso, con crescita rapida e che può dare metastasi primariamente per via linfatica ai linfonodi, o secondariamente per via ematica a milza (37-46%), fegato (16-41%) e altri organi a distanza (cuore 8,3-21%, reni, raramente a polmoni) (Preziosi et al. 2004; Misdorp 2004; Murphy et al. 2006; Welle et al. 2008; Krick et al. 2009; Stefanello et al. 2009; Book et al. 2011; Kiupel et al. 2011; MacNeill 2011; Blackwood et al. 2012; Warland et al. 2014; Sabattini et al. 2015; Stefanello et al. 2015; Camus et al. 2016; Het al. 2016; Scarpa et al. 2016; Śmiech et al. 2017; Horta et al. 2018; Kiupel & Camus 2019; London & Thamm 2020; Oliveira et al. 2020; Pecceu et al. 2020; Berlato et al. 2021; Martins et al. 2021; Willmann et al. 2021; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022a; Paes et al. 2022; Ribeiro et al. 2022). È importante sottolineare che a volte mastocitomi clinicamente benigni possono essere istologicamente di alto grado.

Oltre alla forma cutanea e sottocutanea, esistono anche i mastocitomi mucosali o delle giunzioni muco-cutanee, extracutanei/extramucosali ovvero viscerali senza coinvolgimento della pelle, e una forma sistemica, di raro riscontro e soprattutto nei cani di razze pure di piccola taglia (Takahashi et al. 2000; Welle et al. 2008; Blackwood et al. 2012; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Willmann et al. 2021).

La forma cutanea è la forma di più frequente riscontro, singola (79%) o multipla (5-25%). La forma multipla si caratterizza per la comparsa contemporanea di noduli situati in diverse sedi e deve essere differenziata da eventuali noduli satelliti, che solitamente si sviluppano lungo il corso dei dotti linfatici a partire da una neoformazione primaria (Miller 1995; Misdorp 2004; Murphy et al. 2006; Mullins et al. 2006; Welle et al. 2008; Blackwood et al. 2012; O'Connell & Thomson 2013; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Oliveira et al. 2020; Martins et al. 2021; Willmann et al. 2021; Bellamy & Berlato 2022).

Si riscontrano maggiormente MCT multipli in: Golden Retriever, Carlini, Boxer e Shar-Pei, (Murphy et al. 2006; Welle et al. 2008; Śmiech et al. 2017, 2019).

Nonostante alcuni studi dimostrino una ridotta sopravvivenza in cani con mastocitomi multipli rispetto a mastocitomi singoli, (Kiupel *et al.* 2005; Preziosi *et al.* 2007) la maggior parte degli autori non rileva differenze tra le due forme (Mullins *et al.* 2006; Murphy *et al.* 2006; O'Connell & Thomson 2013; London & Thamm 2020), altri riportano un'ottima prognosi a lungo termine e ridotto potenziale metastatico in mastocitomi multipli dopo escissione chirurgica (Welle *et al.* 2008). Inoltre, in presenza di mastocitomi multipli ma senza coinvolgimento linfonodale non aumenta il rischio di metastasi rispetto a mastocitomi singoli o multipli ma con coinvolgimento linfonodale (Warland *et al.* 2014; Horta *et al.* 2018; De Nardi *et al.* 2022). È quindi evidente che ciò che influisce sull'outcome clinico e sulla prognosi del paziente sono le caratteristiche clinico-patologiche dei singoli mastocitomi, indipendenti gli uni dagli altri o dal numero di neoformazioni (Murphy *et al.* 2006; Stefanello D. & Ferrari R. 2016).

Non si riportano differenze significative tra la forma singola e multipla nella distribuzione del grado istologico, nell'infiltrazione dei tessuti circostanti e nell'outcome post-chirurgico (Murphy *et al.* 2006; Kiupel *et al.* 2011).

Vari studi riportano frequenze differenti per le varie sedi di comparsa del mastocitoma; il tronco viene riportato come sito di maggior frequenza, 28-60% (Şmiech *et al.* 2017; Śmiech *et al.* 2018; Bellamy & Berlato 2022), seguito dalla cute degli arti (25-40%) e da testa e collo (10-15%) (Miller 1995; Welle *et al.* 2008; Şmiech *et al.* 2017, 2018; London & Thamm 2020; Oliveira *et al.* 2020; Martins *et al.* 2021; Bellamy & Berlato 2022; De Nardi *et al.* 2022). Altri siti di frequenza elevata sono scroto, regione perineale (36-40%), inguine (11-13%) e cavo ascellare (Misdorp 2004; Şmiech *et al.* 2018; Oliveira *et al.* 2020; Bellamy & Berlato 2022).

La forma muco-cutanea è rara, si presenta nelle regioni labiale, prepuziale, vulvare, perianale e nel letto subungueale (Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Willmann *et al.* 2021). La forma viscerale è rara, può svilupparsi in qualsiasi organo (congiuntiva, cavità orale, ghiandole salivari, nasofaringe, laringe, trachea, ipofisi, uretra, colonna vertebrale) ma è più frequente a livello del primo tratto intestinale (8,5%), soprattutto nei cani di piccola taglia con un tasso di sopravvivenza molto basso (40% a 30 giorni dalla diagnosi, 10% a 6 mesi dalla diagnosi), valvola ileo-ciecale, linfonodi mesenterici craniali, mediastino caudo-dorsale e linfonodi epato-pancreatici. La forma viscerale presenta comunemente metastasi regionali in linfonodi addominali, fegato, milza, e midollo osseo associata a versamento mastocitico addominale o toracico (Takahashi *et al.* 2000; Misdorp 2004;

Stefanello D. & Ferrari R. 2016; London & Thamm 2020; Oliveira et al. 2020; Martins et al. 2021; Willmann et al. 2021).

Ancora più di raro riscontro è la forma sistemica (2%), con mastocitosi, metastasi midollari ossee, mastocitemia da disseminazione e leucemia delle cellule mastocitiche (10% di mastociti circolanti (Willmann *et al.* 2021); spesso la forma sistemica è preceduta da una forma cutanea primaria indifferenziata, mentre è molto rara la leucemia primaria (Misdorp 2004; Welle et al. 2008; London & Thamm 2020; Oliveira et al. 2020; Willmann et al. 2021).

È riportata una correlazione tra localizzazione e grado istologico tumorale. La maggiore frequenza di sviluppo di MCT di grado I-II Patnaik e basso Kiupel è rilevata nelle regioni di testa, collo, arti e tronco (80,2% basso grado) (White et al. 2011; Śmiech et al. 2017; Martins et al. 2021). I mastocitomi di alto grado sono localizzati nella regione ascellare, nel letto ungueale, nella cavità orale e periorale (il 50-60% ha metastasi ai linfonodi regionali), nella regione perianale (66,7% grado III Patnaik e alto grado Kiupel), regione inguinale (73,3% di alto grado), prepuziale (50% alto grado Kiupel) e nelle giunzioni muco-cutanee. Le forme viscerali, qualsiasi sia la localizzazione, e midollari sono associate ad una prognosi infausta (Takahashi et al. 2000; Kosanovich Cahalane et al. 2004; Romansik et al. 2007; Welle et al. 2008; Baginski et al. 2014; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Śmiech et al. 2017; Horta et al. 2018; London & Thamm 2020; Martins et al. 2021; Willmann et al. 2021; Marconato et al. 2022b; Ribeiro et al. 2022). A sostegno di questo, uno studio effettuato su cani con mastocitomi nelle regioni inguinale e perineale non riporta nessun caso di mastocitoma di grado I, il 94% di grado II e il 6% di grado III, confermando il maggior riscontro di mastocitomi di alto grado in tali regioni (Kosanovich Cahalane *et al.* 2004).

I mastocitomi sottocutanei sono solitamente di grado basso/intermedio e presentano quindi una prognosi migliore associata a lunghi tempi di sopravvivenza, un basso tasso di mortalità correlato al mastocitoma (5-9%) e di recidiva (7-9%) (Newman et al. 2007; Welle et al. 2008; Thompson et al. 2011; Blackwood et al. 2012; Sabbatini et al. 2015; Scarpa et al. 2016; Gill et al. 2020; Willmann et al. 2021; Marconato et al. 2022a; Alvarez-Sanchez et al. 2023). Solitamente si riscontrano in forma singola ma possono presentarsi in forma multipla nel 21% dei casi; il 23% dei cani con MCT sottocutanei sviluppa altri mastocitomi, mentre nel 19% dei casi si sviluppa secondariamente a mastocitomi cutanei (Gill *et al.* 2020).

La presenza di metastasi al momento della diagnosi è un fattore prognostico negativo che comporta ridotto tempo di sopravvivenza. Il tasso metastatico nei tumori di basso grado è <10% mentre in quelli di alto grado è 55-96%. Il grado intermedio nell'80% ha progressione benigna mentre il restante 20% è aggressivo con un potenziale metastatico del 5-22% (Patnaik et al. 1984; Welle et al. 2008; Stefanello et al. 2009; O'Connell & Thomson 2013; Sabattini et al. 2015; Camus et al. 2016; Gill et al. 2020; De Nardi et al. 2022; Ribeiro et al. 2022).

La metastasi a distanza è meno frequente (4,1-22,9%) ma comportano una peggiore prognosi (Kiupel et al. 2011; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Ribeiro et al. 2022). Il ritrovamento di metastasi midollari solitamente è associato a malattia sistemica, quindi da considerarsi come fattore prognostico negativo, prognosi infausta e ridotto tempo di sopravvivenza (Ribeiro *et al.* 2022; Rinaldi *et al.* 2022).

Tumori di dimensioni maggiori di 3 cm di diametro, ulcerati oppure associati a malattia sistemica hanno maggiore probabilità di sviluppare metastasi (Blackwood et al. 2012; Stefanello et al. 2015; London & Thamm 2020; Willmann et al. 2021; Bellamy & Berlato 2022).

3.4 PRESENTAZIONE CLINICA

I mastocitomi hanno una grande variabilità di segni clinici che possono essere correlati al grado istologico; possono presentarsi poco definiti, pruriginosi, alopecici, più o meno eritematosi, solitamente non pigmentati, di differenti dimensioni, ulcerati nel 30% dei casi e soprattutto se indifferenziati, con tessuto circostante più o meno infiammato ed edematoso (Welle et al. 2008; MacNeill 2011; Blackwood et al. 2012; Śmiech et al. 2017; Kiupel & Camus 2019; London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022) (Figura 1, 2, 3).

Dal punto di vista clinico possono essere erroneamente confusi con lipomi, soprattutto i mastocitomi sottocutanei (Blackwood et al. 2012; London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022). È riportato in alcuni casi cambiamento delle dimensioni successivo a manipolazioni a causa della degranolazione dei mastociti e quindi al rilascio di istamina (Welle et al. 2008; London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022).



Figura 1 - Mastocitoma cutaneo tarsale sinistro, ulcerato.



Figura 2 - Mastocitoma cutaneo avambraccio sinistro, alopecico.

La degranolazione dei MCT può causare segni clinici secondari o sindromi paraneoplastiche, presenti in circa il 50% dei cani con mastocitoma, tra cui: eritema con edema perilesionale (definito segno di Darier), arrossamento e prurito. Altre alterazioni possono essere eosinofilia (rilascio di fattori chemiotattici eosinofili), basofilia, mastocitemia (presente nel 50% dei cani con MCT viscerale dove risulta essere più di frequente riscontro rispetto ai mastocitomi cutanei), alterazioni della coagulazione, trombocitopenia e trombocitosi causate da CID, e anemia da invasione midollare o da



Figura 3 - Mastocitoma cutaneo regione occipitale, ulcerato.

perdite ematiche; in stadi più gravi della malattia si possono riscontrare febbre, meno frequentemente ipotensione e collasso cardio-circolatorio (reazione anafilattica da istamina). Possono esserci inoltre complicanze gastrointestinali associate alla presenza di recettori H2 istaminici stimolanti la produzione di acido gastrico. Sono per lo più correlate a mastocitomi aggressivi che contengono fino a cinquanta volte la concentrazione di istamina rispetto ai mastocitomi di basso grado (Welle et al. 2008; London & Thamm 2020). In caso di coinvolgimento gastroenterico, i sintomi sono: vomito, dolore addominale, diarrea e ulcerazioni nel 33-83,3% dei casi, con conseguente ematemesi, anoressia, ematochezia, melena, anemia da perdita, peritonite e setticemia (Howard et al. 1969; Takahashi et al. 2000; Welle et al. 2008; Kiupel et al. 2011; Blackwood et al. 2012; O'Connell & Thomson 2013; Horta et al. 2018; London & Thamm 2020; Willmann et al. 2021; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022; Ribeiro et al. 2022). I soggetti con MCT di grandi dimensioni, di alto grado e con crescita rapida, infiltrato nei tessuti circostanti, con metastasi o malattia sistemica hanno maggiori probabilità di sviluppare sintomatologia dovuta al rilascio istaminico (Blackwood et al. 2012; Stefanello et al. 2015; London & Thamm 2020; Bellamy & Berlato 2022).

Segni clinici predittivi di una scarsa prognosi e associati frequentemente a metastasi sono: ulcerazione del mastocitoma, segni di Darier, crescita irregolare, infiltrazione nei tessuti circostanti e presenza di noduli satelliti lungo il decorso linfatico o attorno alla neoformazione (Welle et al. 2008; Blackwood et al. 2012; Stefanello et al. 2015; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; London & Thamm 2020; Bellamy & Berlato 2022; Marconato et al. 2022).

La presenza di segni sistemici quali ipotensione, vomito, melena ed eritema diffuso da degranolazione sono spesso associati a forme viscerali o disseminate e di conseguenza hanno prognosi infausta, con tempi di sopravvivenza breve e quasi la totalità di decessi per mastocitoma (Blackwood et al.

2012; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; London & Thamm 2020). Anche la linfadenomegalia è considerata un fattore prognostico negativo poiché associata alla metastasi linfonodale nella maggior parte dei casi e/o a diffusione sistemica e a ridotto tempo di sopravvivenza, nonostante non venga esclusa la possibilità di metastasi in un linfonodo non megalico (Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Pecceu et al. 2020; Marconato & Foglia 2021; Marconato et al. 2022; Ribeiro et al. 2022).

3.5 STAGING CLINICO

La stadiazione clinica ha l'obiettivo di definire l'estensione della malattia, decidere il trattamento più adeguato e formulare una prognosi più accurata possibile, utilizzando diverse procedure diagnostiche come campionamenti citologici o bioptici, e tecniche di imaging (Krick et al. 2009; Blackwood et al. 2012; Stefanello et al. 2015; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Horta et al. 2018; London & Thamm 2020; Oliveira et al. 2020; Willmann et al. 2021; Marconato et al. 2022).

La Società Italiana di Oncologia Veterinaria (SIONCOV) ha proposto recentemente delle linee guida per la stadiazione clinica del mastocitoma cutaneo canino, indicando le indagini necessarie per stadare e trattare il mastocitoma cutaneo e sottocutaneo del cane (Marconato et al. 2022a).

Il primo step della stadiazione clinica prevede una valutazione generale dello stato di salute del paziente, tramite esame obiettivo generale, esami ematobiochimici e delle urine ed eventuali diagnosi collaterali necessarie per identificare potenziali comorbidità che potrebbero influenzare la tipologia di trattamento del MCT e la sopravvivenza dell'animale.

Prima di procedere con ulteriori indagini, è necessario eseguire un esame citologico di tutte le neoformazioni riscontrate alla visita clinica. Infatti, come già descritto in precedenza, alcuni MCT presentano segni clinici molto caratteristici ma la conferma del sospetto diagnostico deve sempre essere effettuata tramite citologia e non è raro riscontrare MCT multipli.

3.5.1 Citologia del mastocitoma

L'esame citologico è una tecnica economica poco invasiva, rapida, che non richiede sedazione dell'animale quando effettuata su lesioni palpabili o su linfonodi esplorabili e consente una diagnosi precoce, che a sua volta facilita la programmazione di un iter diagnostico e agevola la pianificazione terapeutica (Stefanello et al. 2009; MacNeill 2011; Scarpa et al. 2016; Ku et al. 2017; De Nardi et al. 2022). Tuttavia, l'esame citologico non raggiunge la stessa accuratezza dell'analisi istologica,

pertanto l'esame istologico deve sempre essere eseguito, al fine di stabilire il grado istologico, valutare la completezza dell'escissione chirurgica ed eseguire eventuali indagini immunohistochimiche per una migliore caratterizzazione del tumore (De Nardi *et al.* 2022).

Generalmente, l'esame citologico viene effettuato tramite l'utilizzo di ago sottile, solitamente 26G, allo scopo di ridurre il sanguinamento e massimizzare l'accuratezza diagnostica; può essere eseguito per agoinfissione o agoaspirazione (FNA). Per ottenere una rappresentazione più completa e accurata della struttura analizzata, si consiglia di effettuare il campionamento in diverse aree della lesione (MacNeill 2011; De Nardi *et al.* 2022).

I mastocitomi solitamente esfoliano facilmente e i preparati sono usualmente cellulari. La caratteristica principale è la presenza di granuli citoplasmatici purpurei evidenziabili con diverse colorazioni (Figura 4, 5). La colorazione più utilizzata è quella di tipo Diff-Quik™ che permette di ottenere rapidamente una diagnosi. Va sottolineato però che tale colorazione non riesce sempre a identificare i caratteristi granuli, portando ad una diagnosi errata. Si consiglia quindi di usare colorazioni come May-Grünwald-Giemsa (MGG) o Blu di Toluidina, che colora i granuli di blu (Welle *et al.* 2008; MacNeill 2011; Blackwood *et al.* 2012; Hergt *et al.* 2016; De Nardi *et al.* 2022; Paes *et al.* 2022). In caso di MCT di alto grado o poco granulari, la diagnosi può essere difficile seppur presenti anisocitosi e anisocariosi marcate (Kiupel *et al.* 2004; Blackwood *et al.* 2012; De Nardi *et al.* 2022).

La citologia presenta alcune limitazioni: l'incapacità di distinguere tra mastocitoma cutaneo e sottocutaneo, una bassa densità cellulare in dieci campi ad alto ingrandimento (HPF) rispetto all'istologia e la difficoltà nel valutare l'attività mitotica, che è eterogenea in diversi punti del tumore. Un'ulteriore limitazione è l'uso dei coloranti che potrebbero evidenziare i granuli ma nascondere i nuclei (come le colorazioni ematologiche e May-Grunwald Giemsa) oppure enfatizzare i nuclei a discapito dei granuli (come ematossilina ed eosina, Papanicolau, blu di Toluidina) (Hergt *et al.* 2016; Scarpa *et al.* 2016; Avallone *et al.* 2021; Berlato *et al.* 2021).

Sono stati pubblicati alcuni schemi classificativi nel corso degli ultimi anni. Il sistema di classificazione introdotto da Scarpa *et al.* nel 2014 prevede la suddivisione dei mastocitomi in due categorie, alto e basso grado. Tale classificazione si basa sull'applicazione dei criteri istologici della classificazione Kiupel a livello citologico. Con questa classificazione, la citologia risulta concordante col grado istologico nel 94% dei casi, presentando una sensibilità dell'84,6%. Ciò significa che

questo sistema tende a sottostimare i mastocitomi di alto grado (Scarpa et al. 2014; Berlato et al. 2021; De Nardi et al. 2022).

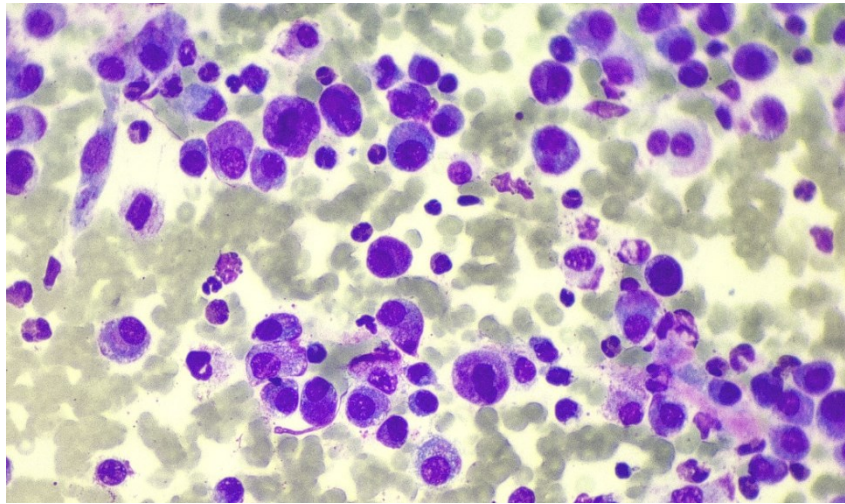


Figura 4 – Esame citologico di mastocitoma scarsamente differenziato, classificazione secondo Camus et al., Paes et al., Scarpa et al., colorazione Diff-Quik™

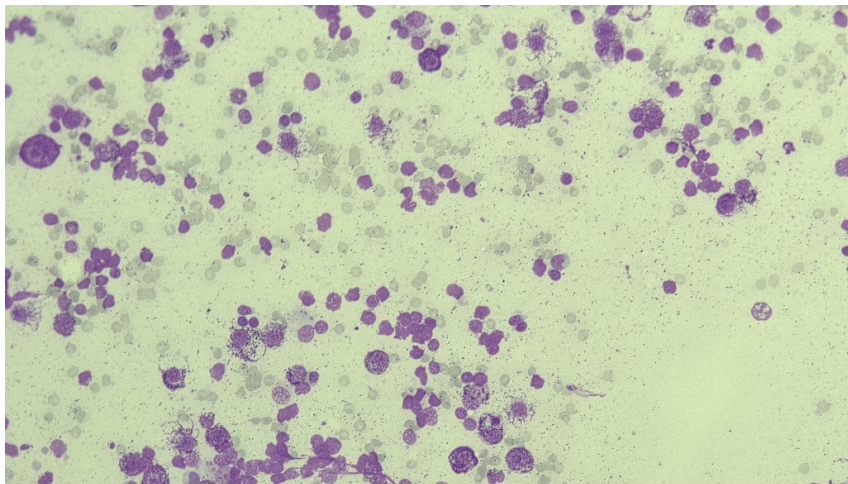


Figura 5 – Esame citologico di mastocitoma scarsamente differenziato, classificazione secondo Camus et al., Paes et al., Scarpa et al., colorazione Diff-Quik™

Nel 2016, Camus e colleghi hanno sviluppato un algoritmo per identificare i mastocitomi di alto e basso grado, correlandoli all'outcome dei pazienti (Tabella 1). I MCT vengono classificati come alto grado (HG) se sono poco granulari o se hanno almeno due delle seguenti caratteristiche: presenza di figure mitotiche, pleomorfismo nucleare, cellule multi o binucleate e più del 50% di anisocariosi. La concordanza tra il grado istologico e quello citologico è risultata pari al 94% (Camus et al. 2016; De Nardi et al. 2022). Inoltre, gli autori hanno valutato anche la concordanza di questo sistema tra patologi. La concordanza della diagnosi citologica totale era del 75,5%, del 73,6% nelle diagnosi di basso grado e nell'81,8% nell'alto grado (Kiupel et al. 2004; Blackwood et al. 2012; De Nardi et al. 2022). Correlando la diagnosi citologica con l'outcome ne è emerso che i MCT di basso grado sono associati ad un tempo di sopravvivenza maggiore, mentre quelli di alto grado ad uno minore. In

particolare, i mastocitomi di alto grado presentano un rischio di mortalità 25 volte superiore rispetto a quelli di basso grado, nonché un aumento significativo del rischio di recidiva (Camus et al. 2016).

Basso grado	Alto grado
Abbondanti granuli citoplasmatici	Scarsi granuli citoplasmatici
<i>Oppure</i> <i>se presenti almeno due caratteri di malignità è definibile alto grado.</i>	
Assenza di figure mitotiche	Presenza di figure mitotiche
Anisocariosi inferiore al 50%	Anisocariosi superiore al 50%
Assenza di cellule bi o multinucleate	Presenza di almeno una cellula bi o multinucleata
Assenza di pleomorfismo nucleare	Presenza di pleomorfismo nucleare

Tabella 1 – Classificazione citologica del mastocitoma cutaneo canino Camus et al. 2016.

La classificazione citologica più recente è quella di Paes et al. 2022 (Tabella 2), che distingue l'alto grado dal basso grado in base alla presenza di granulazione citoplasmatica, alla concentrazione di componenti fibroblastici o fibrille di collagene e alle mitosi. Si è osservato che la presenza di fibre di collagene è inversamente proporzionale alla mortalità: maggiore è la presenza di fibre, minore è la mortalità e viceversa. L'accordo tra i patologi in questa classificazione è del 77%, con una percentuale di falsi positivi del 45% e falsi negativi del 10% (Paes et al. 2022).

Basso grado	Alto grado
<i>Primo step</i>	
Numerosi granuli citoplasmatici ben evidenti	Granuli citoplasmatici poco visibili
<i>Oppure</i> <i>se presenti almeno due caratteri di malignità è definibile alto grado.</i>	
Cariomegalia assente	Cariomegalia presente
Multinucleazione assente	Multinucleazione presente
Mitosi assenti	Mitosi presenti
Collagene e fibroblasti abbondanti	Collagene e fibroblasti scarsi o assenti

Tabella 2 – Classificazione citologica del mastocitoma canino secondo Paes et al. 2022.

3.5.2 Individuazione clinica linfonodo regionale e citologia linfonodale

Il mastocitoma tipicamente metastatizza ai linfonodi prima di diffondersi in altri organi. La presenza di metastasi linfonodali rappresenta un fattore prognostico sfavorevole (Forte et al., 2006; Krick et al., 2009; Worley, 2012; Weishaar et al., 2014; Stefanello et al., 2015; Grimes et al., 2020; Pecceu et al., 2020; Randall et al., 2020; Willmann et al., 2021; De Bonis et al., 2022; Guerra et al., 2022). La citologia linfonodale riveste quindi un ruolo importante nella determinazione dello status metastatico dei linfonodi e nel fornire informazioni prognostiche (Bostock 1973; Owen et al. 1980; Murphy et al. 2006; Stefanello et al. 2009; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Ku et al. 2017; London & Thamm 2020; Willmann et al. 2021; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022). Tuttavia, è importante considerare che questa tecnica ha una sensibilità del 68-75% e una specificità 54% nella rilevazione di metastasi, pertanto occorre interpretare con cautela i risultati di tale metodica e solo l'esame istologico permette di avere una diagnosi definitiva (Baginski et al. 2014; Ku et al. 2017; Ferrari et al. 2021a; Marconato & Foglia 2021; De Nardi et al. 2022).

La presenza di linfoadenomegalia può essere indice di metastasi linfonodali. Tuttavia, uno studio ha identificato che il 50% dei linfonodi regionali ritenuti clinicamente normali era metastatico all'esame istologico (Ferrari *et al.* 2018). Pertanto, le dimensioni del linfonodo non sempre si correlano con lo stato metastatico dello stesso.

Quando i linfonodi risultano palpabili, il prelievo citologico viene effettuato manualmente; nel caso in cui i linfonodi non siano palpabili o intracavitari, l'approccio preferenziale è quello eco-guidato (Stefanello D. & Ferrari R. 2016).

Suami e colleghi hanno condotto uno studio sull'organizzazione del sistema linfatico cutaneo canino, individuando dieci aree chiamate "linfosomi", ciascuna associata ad un bacino linfatico di drenaggio. Tuttavia, non sono stati identificati confini precisi di tali territori. Questi linfosomi non corrispondono esattamente alle regioni anatomiche, per cui è fondamentale seguire questo modello di drenaggio per identificare il linfonodo regionale corrispondente all'area dove è situata la neoformazione (Suami et al. 2013; Ferrari et al. 2021b; Marconato & Foglia 2021).

Nel 2009, è stata pubblicata una classificazione citologica dei linfonodi con lo scopo di fornire una descrizione accurata dei criteri per distinguere linfonodi reattivi da quelli metastatici (Tabella 3). In totale sono state descritte cinque classi. Un linfonodo viene classificato come normale in assenza di mastociti e reattivo se essi sono sporadici e singoli. Un linfonodo possibilmente metastatico presenta due o tre gruppi di mastociti, mentre nel probabilmente metastatico si osservano oltre tre aggregati di mastociti formati da due-tre cellule ciascuno oppure due-cinque aggregati di mastociti, ciascuno con più di tre cellule. La categoria di "Metastasi certa" è caratterizzata dalla presenza di mastociti, singoli o aggregati, che sostituiscono il tessuto linfatico, scarsamente differenziati, con variazioni di forma, dimensione dei nuclei, e presenza di granuli ridotti o variabili. Inoltre, sono evidenti più di cinque aggregati di mastociti, ciascuno composto da più di tre mastociti (Krick *et al.* 2009; Stefanello D. & Ferrari R. 2016). Questa classificazione ha alcuni svantaggi che sono difficoltà di esecuzione e costo elevato, poiché richiede analisi citologiche più approfondite e più difficili da eseguire. Inoltre, non tutte le classi identificate presentano parametri ben definiti. È comunque una classificazione con buona concordanza tra i patologi e con buona predittività diagnostica (Krick *et al.* 2009; Baginski *et al.* 2014; Ku *et al.* 2017).

Diagnosi citologica	Descrizione
Linfonodo normale	Assenza di mastociti
Linfonodo reattivo	Oltre il 50% di piccoli linfociti, linfociti meno differenziati, linfoblasti, plasmacellule, scarsi o moderati macrofagi, eosinofili, neutrofilo, rari ed isolati mastociti
Possibile metastasi	In un campione citologico, presenza di 2 o 3 aggregati di mastociti
Probabile metastasi	In un campione citologico, presenza di almeno 3 aggregati di mastociti formati da due o tre cellule, oppure presenza di 3-5 aggregati con almeno 3 mastociti ciascuno.
Metastasi certa	In un campione citologico, presenza di numerosi mastociti singoli o aggregati, scarsamente differenziati, anomali in forma, dimensione e nuclei e con poca granulazione citoplasmatica, oppure presenza di almeno 5 aggregati con almeno 3 mastociti ciascuno.

Tabella 3 – Valutazione citologica della metastasi linfonodale nel mastocitoma secondo Krick *et al.* 2009.

3.5.3 Ricerca metastasi a distanza e citologia fegato e milza

Nonostante le tecniche di imaging siano poco sensibili nel rilevare metastasi, radiografie toraciche ed ecografia addominale sono comunque consigliate in determinate situazioni. Queste comprendono casi di pazienti anziani, quando è necessario escludere patologie sottostanti, in presenza di sintomi sistemici e per valutare le strutture linfonodali interne (London & Thamm 2020; Pecceu et al. 2020; Willmann et al. 2021; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022; Rinaldi et al. 2022). In particolare, le radiografie al torace non sono consigliate per la ricerca di metastasi polmonari, che sono molto rare, ma per valutare eventuali linfadenomegalie sternali.

L'ecografia addominale standard se non associata all'esame citologico non è ottimale per la ricerca di metastasi viscerali a fegato e milza, ovvero agli organi bersaglio dopo i linfonodi, poiché non permette di discriminare tra organi infiltrati e non infiltrati (Finora et al. 2006; Book et al. 2011; Pecceu et al. 2020; Marconato et al. 2022a; Rinaldi et al. 2022). In assenza di anomalie ecografiche la citologia può risultare positiva. Infatti, non si riportano correlazioni significative tra il pattern ecografico di fegato e milza con la presenza di metastasi in tali organi (Stefanello et al. 2009; Book et al. 2011). L'esame ecografico per la ricerca di metastasi viscerali riporta tassi di sensibilità del 43-71% e tassi di specificità del 68-93%, rispettivamente per infiltrazione splenica ed epatica. Ciò comporta un basso potere predittivo, confermando che l'ecografia da sola non è adeguata nel determinare la presenza di metastasi viscerali (Stefanello et al. 2009; Book et al. 2011; Pecceu et al. 2020; Willmann et al. 2021; De Nardi et al. 2022; Rinaldi et al. 2022) ma deve essere sempre accompagnata dalla citologia di tali organi bersaglio. Questa tecnica è fondamentale soprattutto nei casi di mastocitomi poco differenziati e con metastasi certe o probabili al linfonodo regionale, oppure in presenza di almeno un fattore prognostico negativo (Stefanello et al. 2009; Book et al. 2011; Blackwood et al. 2012; Hergt et al. 2016; Scarpa et al. 2016; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; London & Thamm 2020; Pecceu et al. 2020; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022; Rinaldi et al. 2022; Alvarez-Sanchez et al. 2023).

Le citologie del fegato e della milza sono considerate sicure e generalmente non richiedono la valutazione di parametri coagulativi (Stefanello et al. 2009; Book et al. 2011; Pecceu et al. 2020).

L'interpretazione dei preparati citologico non risulta semplice ad occhi non esperti. Infatti, la sola presenza di mastociti non è indicativa di metastasi (Finora et al. 2006; Stefanello et al. 2009; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Pecceu et al. 2020).

Nuove metodologie di classificazione stabiliscono che la citologia risulta positiva per metastasi al fegato e alla milza se si rilevano cluster di mastociti ben differenziati, numerosi mastocitomi ben differenziati o mastocitomi atipici (pleomorfici e con pochi granuli). Al contrario, risulta negativa se non sono presenti mastociti o se sono presenti pochi o sparsi mastociti ben differenziati, o se i mastociti presenti sono principalmente associati al tessuto connettivo. Tuttavia, va sottolineato che questa valutazione può variare in base alla soggettività del patologo (Stefanello *et al.* 2009) (Tabella 4).

Organo negativo per metastasi	Mastociti assenti
	Mastociti rari e isolati
	Mastociti associati al connettivo
Organo positivo per metastasi	Cluster di mastociti ben differenziati
	Mastociti ben differenziati in numero elevato
	Mastociti atipici

Tabella 4 – criteri di diagnosi citologica per metastasi di mastocitoma a fegato e milza secondo Stefanello *et al.* 2009.

In un ulteriore studio condotto sui tumori di alto grado, è stata effettuata una valutazione delle metastasi al fegato e alla milza, distinguendo tra esenti da metastasi, metastasi precoci e metastasi certe. Per quanto riguarda il fegato, le metastasi sono state definite in base alla quantità di mastociti presenti ogni 100 epatociti: da 0 a 1 mastociti, da 2 a 4 mastociti, e la presenza di cluster o più di 5 mastociti ben granulati ogni 100 epatociti, rispettivamente. Per la milza, la valutazione comprende: assenza di mastociti o rari mastociti singoli ben granulati, leggero aumento soggettivo di mastociti singoli non associati al tessuto connettivo, presenza di cluster o significativo aumento soggettivo di mastociti ben granulati o mastociti con morfologia atipica, rispettivamente (Pecceu *et al.* 2020) (Tabella 5).

Fegato	Esente da metastasi	0-1 mastociti/100 epatociti
	Metastasi precoce	2-4 mastociti/100 epatociti
	Metastasi certe	≥ 5 mastociti/100 epatociti o cluster di mastociti
Milza	Esente da metastasi	Assenza/rari mastociti singoli ben granulati
	Metastasi precoce	Leggero aumento di mastociti singoli non associati al connettivo
	Metastasi certe	Cluster o significativo aumento di mastociti ben granulati o mastociti con morfologia atipica

Tabella 5 – criteri di diagnosi citologica per metastasi di mastocitoma a fegato e milza secondo Pecceu *et al.* 2020.

In caso di metastasi viscerali e di malattia sistemica non è consigliata né l'identificazione del linfonodo sentinella né la chirurgia, ma è stato suggerito da alcuni autori di eseguire la valutazione del buffy coat e la citologia midollare (Blackwood et al. 2012; Hergt et al. 2016; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022; Pecceu et al. 2020). Il test del "buffy coat", utilizzato per rilevare la presenza dei mastociti circolanti nel sangue, si dimostra positivo nel 21% dei soggetti, i quali spesso presentano già metastasi negli organi bersaglio. È importante considerare che questa tecnica è stata abbandonata, in quanto altre patologie possono manifestare la presenza di mastocitomi nel sangue, rendendo difficile una diagnosi accurata (Finora et al. 2006; Book et al. 2011; London & Thamm 2020). La citologia midollare non è una pratica routinaria essendo l'infiltrazione midollare di raro riscontro e principalmente in mastocitomi di alto grado; lo stesso campione midollare non è sempre diagnostico, anche prelevato dallo stesso paziente in diversi punti (Finora et al. 2006; Blackwood et al. 2012; Warland et al. 2014; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; London & Thamm 2020; Willmann et al. 2021; Rinaldi et al. 2022).

È importante tenere presente che l'analisi del sangue periferico e del midollo osseo non modifica la prognosi quando già sono presenti metastasi viscerali, ad esempio al fegato e alla milza (Stefanello D. & Ferrari R. 2016). Non esistono linee guida standard per definire la positività al midollo osseo, ma di solito si considera positivo se la percentuale di mastociti tipici supera il 10%, o oltre il 5% nel caso di mastociti atipici (Stefanello D. & Ferrari R. 2016).

3.5.4 Assegnazione stadio clinico

Sulla base dei risultati ottenuti con le tecniche descritte in precedenza, viene assegnato uno stadio clinico. Il sistema utilizzato a livello mondiale è quello TNM proposto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. Specificatamente per il mastocitoma cutaneo, la classificazione WHO prevede cinque stadi di malattia identificati da 0 a IV. Esistono poi due sottostadi (a o b) associati all'assenza o presenza di sintomi sistemici (Tabella 6).

Gli stadi 0 e I comprendono pazienti senza coinvolgimento linfonodale e con mastocitoma rispettivamente asportato in modo incompleto e singolo; lo stadio II comprende pazienti con coinvolgimento linfonodale ma con mastocitoma singolo, mentre nello stadio III sono classificati mastocitomi multipli oppure mastocitomi singoli di grandi dimensioni e infiltranti, con o senza coinvolgimento linfonodale. Nello stadio IV rientrano tutti i pazienti metastatici a distanza (compreso sangue e midollo) o recidivanti. Il grading istologico della neoformazione non ne

modifica lo stadio clinico (Murphy et al. 2006; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Horta et al. 2018; Willmann et al. 2021; De Nardi et al. 2022).

Pazienti classificati in stadio 0 e I hanno tempi di sopravvivenza più lunghi rispetto a stadi clinici più avanzati; la prognosi è ridotta per gli stadi III e IV (Murphy *et al.* 2006; Welle *et al.* 2008; Worley 2012). Gli stadi clinici III, IV e V WHO sono correlati a maggior rischio di metastasi e morti correlate al mastocitoma (O’Connell & Thomson 2013; Horta et al. 2018; De Bonis et al. 2022).

STADIO CLINICO	DEFINIZIONE	
0	Mastocitoma asportato in modo incompleto, senza coinvolgimento linfonodale	
	a	senza segni sistemici
	b	Con segni sistemici
I	Mastocitoma singolo, senza coinvolgimento linfonodale	
	a	senza segni sistemici
	b	Con segni sistemici
II	Mastocitoma singolo, con coinvolgimento linfonodale	
	a	senza segni sistemici
	b	Con segni sistemici
III	Mastocitoma multiplo o mastocitoma singolo di grandi dimensioni e infiltrante, con o senza coinvolgimento linfonodale	
	a	senza segni sistemici
	b	Con segni sistemici
IV	Qualsiasi mastocitoma con metastasi a distanza o recidiva	

Tabella 6 – Stadi clinici del mastocitoma secondo la World Health Organisation (Owen et al. 1980).

È stata proposta una modifica della classificazione WHO (Horta *et al.* 2018), definendo cinque classi per identificare più precisamente lo stadio clinico e la progressione della malattia; inoltre, il mastocitoma multiplo viene considerato con comportamento biologico meno aggressivo rispetto al mastocitoma multiplo della vecchia stadiazione WHO (Owen *et al.* 1980). Gli stadi I e II comprendono pazienti senza coinvolgimento linfonodale, con mastocitomi rispettivamente singoli e multipli; negli stadi III e IV sono classificati pazienti con coinvolgimento linfonodale, con mastocitomi singoli nello stadio III, mentre nello stadio IV possono essere multipli oppure singoli

di grandi dimensioni e infiltranti. Nello stadio V vi sono pazienti con mastocitoma singolo o multiplo ma con metastasi a distanza (compresa l'invasione midollare e la mastocitemia) (Horta *et al.* 2018; Willmann *et al.* 2021).

Esiste un altro sistema di stadiazione clinica proposto dalla South European Veterinary Conference (SEVC), che considera la presentazione clinica della neoformazione, l'infiltrazione dei tessuti e la presenza di metastasi. Gli stadi I e II comprendono neoformazioni <3 cm ben circoscritte e non ulcerate, rispettivamente singole e multiple distanti almeno 10 cm tra loro; lo stadio III prevede mastocitomi >3cm ben circoscritti e non ulcerati, in forma singola o multipla distanti meno di 10 cm tra loro. Negli stadi IV e V rientrano pazienti con qualsiasi tipo di lesione, ma nello stadio IV con coinvolgimento linfonodale e nel V pazienti metastatici con o senza coinvolgimento linfonodale (De Nardi *et al.* 2022).

Si ritiene fondamentale valutare contemporaneamente alla stadiazione clinica i fattori prognostici negativi, ben descritti in letteratura ma non considerati in nessuna classificazione fin ora pubblicata (Horta *et al.* 2018; De Nardi *et al.* 2022). I fattori prognostici che influenzano l'outcome clinico sono: grado istologico, stadio clinico, localizzazione della neoformazione, recidiva, tasso di crescita e indici proliferativi, presenza di mutazioni genomiche, dimensioni e presentazione clinica della neoformazione, presenza di segni clinici secondari o sindromi paraneoplastiche, razza e età (Welle *et al.* 2008; Krick *et al.* 2009; White *et al.* 2011; London & Thamm 2020; Pecceu *et al.* 2020). In presenza di uno o più di questi fattori prognostici, è necessaria la completa stadiazione prima della chirurgia (Pecceu *et al.* 2020; Marconato *et al.* 2022a).

3.5.5 Linfonodo sentinella

Il linfonodo regionale drena l'area anatomica in cui si è sviluppato il tumore, mentre il linfonodo sentinella è la prima stazione linfonodale in cui il tumore drena e quindi la prima sede di metastatizzazione. I MCT possono drenare al linfonodo regionale oppure ad un linfonodo di una differente regione anatomica; di conseguenza il linfonodo sentinella può o meno coincidere con quello regionale. La non corrispondenza tra regionale e sentinella è dimostrata in percentuale variabile in base agli studi condotti (22-80%) (Warland *et al.*, 2014; Worley, 2014; Ferrari *et al.*, 2018; Rossi *et al.*, 2018; Grimes *et al.*, 2020; Ferrari *et al.*, 2020; Randall *et al.*, 2020; Ferrari, Boracchi, *et al.*, 2021; Ferrari, Zani, *et al.*, 2021; Lapsley *et al.*, 2021; Marconato & Foglia, 2021;

Willmann et al., 2021; Marconato et al., 2022a; De Bonis et al., 2022; Rinaldi et al., 2022; Alvarez-Sanchez et al., 2023). È importante inoltre considerare la variabilità individuale nel drenaggio linfatico regionale anche tra pazienti sani (Ferrari et al. 2021b; De Bonis et al. 2022).

È importante identificare il linfonodo sentinella per non incorrere nel rischio di sottostadiare la malattia (Ferrari *et al.* 2021b, 2020). Il riscontro di un linfonodo negativo permette di evitare al paziente una chirurgia troppo aggressiva con la rimozione di ulteriori linfonodi, migliorando così il controllo del dolore grazie alla minore dissezione dei tessuti. Si riducono inoltre gli effetti collaterali dovuti alla chirurgia. Inoltre, consente di ottenere una migliore prognosi (Forte et al., 2006; Stefanello et al., 2009; Book et al., 2011; Worley, 2012; Warland et al., 2014; Grimes et al., 2020; Wan et al., 2021).

Per questi motivi, è fondamentale la mappatura del sentinella e la valutazione della presenza o meno di metastasi in esso, poiché questo può dare informazioni cliniche e prognostiche sull'animale, ridurre i falsi negativi, e permette di programmare correttamente l'iter terapeutico (Blackwood et al., 2012; Worley, 2014; Forte et al., 2016; Hergt et al., 2016; Grimes et al., 2017, 2020; Ferrari et al., 2020; London & Thamm, 2020; Pecceu et al., 2020; Book et al., 2021; Ferrari, Boracchi, et al., 2021; Ferrari, Zani, et al., 2021; Marconato & Foglia, 2021; Wan et al., 2021; De Bonis et al., 2022; De Nardi et al., 2022; Marconato et al., 2022; Alvarez-Sanchez et al., 2023).

Quando viene eseguito il mapping, si possono riscontrare tre possibili scenari: la corrispondenza tra linfonodo regionale e sentinella può essere assente, e quindi drenare completamente in un linfonodo differente, può essere completa quando il linfonodo sentinella corrisponde al regionale. In alternativa, la corrispondenza può essere parziale nel momento in cui il tumore viene drenato da più linfonodi sentinella, dei quali uno corrisponde al regionale (Marconato & Foglia 2021; De Bonis et al. 2022). È infatti riportato che lo stesso tumore può essere drenato da più linfocetri diversi nel 34% dei casi (De Bonis *et al.* 2022; Guerra *et al.* 2022).

3.5.6 Ricerca del linfonodo sentinella e metodiche

In medicina umana, la ricerca del linfonodo sentinella relativamente ad altri tipi di tumore dimostra un'accuratezza del 98%. Per cui se il linfonodo sentinella è negativo per metastasi, gli altri linfonodi saranno presumibilmente esenti. Viceversa, se il linfonodo sentinella è positivo, la possibilità di riscontrare metastasi in altre sedi è alta e la prognosi del paziente è peggiore (Rossi et al. 2018; Marconato & Foglia 2021).

In medicina umana, la metodica gold standard per la ricerca del linfonodo sentinella è la linfoscintigrafia preoperatoria solitamente associata all'utilizzo di una metodica intraoperatoria come l'uso di coloranti vitali; al contrario, in veterinaria non esiste una tecnica d'elezione (Grimes et al. 2017, 2020; Ferrari et al. 2021a, 2021b; Marconato & Foglia 2021). Esistono numerose metodiche di ricerca, tra cui: linfangiografia con colorante vitale, linfangiografia radiologica indiretta, linfangiografia tomografica computerizzata indiretta, ultrasonografia contrastografica (CEUS), fluorescenza NIR (near-infrared imaging) e linfoscintigrafia preoperatoria e intraoperatoria (Randall et al., 2020; De Bonis et al., 2022; Wan et al., 2021; Willmann et al., 2021).

Linfoscintigrafia

La linfoscintigrafia è una tecnica di mapping, utilizzabile sia prima sia durante la chirurgia. Essa consiste nell'utilizzo di un radiofarmaco (Tecnezio 99m) iniettato nella zona peritumorale, il quale viene drenato dal linfonodo sentinella e rilevato tramite l'utilizzo di una strumentazione specifica. La linfoscintigrafia consente l'individuazione del linfonodo sentinella nell'89-91% dei casi; quando associato all'uso di un colorante vitale l'accuratezza raggiunge il 91-95% (Ferrari et al., 2020; Ferrari, Zani, et al., 2021; De Bonis et al., 2022; Alvarez-Sanchez et al., 2023). Nonostante l'elevata accuratezza, la linfoscintigrafia presenta numerosi svantaggi, tra cui la radio-esposizione a causa dell'utilizzo di materiale radioattivo, richiedendo l'isolamento del paziente per un periodo di tempo limitato. Inoltre, questa tecnica può essere costosa e presenta una minore risoluzione spaziale rispetto ad altre tecniche, ad esempio la tomografia computerizzata (Grimes et al. 2017; Ferrari et al. 2021b).

Fluorescenza NIR

La tecnica di fluorescenza NIR (near-infrared imaging) è una tecnica diagnostica basata sull'utilizzo di un colorante fluorescente (verde di indiocianina ICG) iniettato in zona peritumorale, il quale drenato dal tumore, viene poi rilevato tramite l'utilizzo di sonde specifiche. Queste sonde

emettono una luce con frequenza vicina agli infrarossi (pari a 780 nm), permettendo così la visualizzazione transcutanea del contrasto all'interno dei vasi e nel linfonodo sentinella. Questa tecnica è utilizzabile prima della chirurgia per identificare il punto di incisione e durante la chirurgia stessa per seguire il drenaggio linfatico. Gli svantaggi possono essere identificati nella profondità di lettura ad un massimo di 2,5 cm, gli alti costi e la necessità di associare una tecnica preoperatoria per identificare i linfocentri coinvolti (Ferrari *et al.* 2021b). I vantaggi sono la visualizzazione in tempo reale di vasi e linfonodo drenanti, l'assenza di radiazioni ionizzanti e l'efficacia comparabile alla linfoscintigrafia (Ferrari *et al.* 2021b; Alvarez-Sanchez *et al.* 2023).

CEUS

L'ultrasonografia contrastografica (CEUS) è una tecnica che consiste nell'utilizzo di un ecografo e un mezzo di contrasto specifico (microbolle gassose rivestite da sostanza lipidica), anche in questo caso iniettato in zona peritumorale. Questa tecnica ha però delle limitazioni; i linfocentri da esaminare devono essere selezionati in precedenza, supponendo quale linfocentro sia il drenante della neoformazione, poiché questa tecnica può solo confermare o meno il drenaggio del linfonodo in esame. Inoltre, con questa tecnica non permangono punti di repere per la chirurgia e quindi deve essere associata a tecniche di mappatura intraoperatorie (Ferrari *et al.* 2021b). Questa tecnica può essere associata all'elastosonografia per valutare una possibile minore elasticità nei linfonodi metastatici, ma quest'ultima non sembra avere correlazioni significative con lo stato metastatico linfonodale (Marconato & Foglia 2021).

La CEUS permette l'identificazione del linfonodo sentinella nel 95-95,2% dei casi (Ferrari *et al.* 2021b; Fournier *et al.* 2021).

Linfografia indiretta tramite radiografie

Un'altra metodica è la linfografia indiretta tramite radiografie, effettuabile solo precedentemente all'intervento chirurgico, ma più accessibile rispetto alla linfoscintigrafia in quanto non richiede attrezzatura specialistica (Ferrari *et al.* 2021b; De Bonis *et al.* 2022). Essa consiste nell'iniezione peritumorale di un mezzo di contrasto lipidico o acquoso radiopaco. Il mezzo di contrasto viene quindi drenato dal linfonodo e rilevato mediante radiografie seriali in intervalli differenti di tempo oppure a 24h in base al tipo di contrasto utilizzato, al fine di seguire il percorso di drenaggio linfatico e individuare il linfonodo sentinella (Ferrari *et al.* 2021b; Marconato & Foglia 2021; De Bonis *et al.* 2022). Questa procedura consente l'individuazione del linfonodo sentinella nel 90-96,6% dei casi

con una correlazione nella rilevazione del linfonodo sentinella col colorante vitale nell'84,6% dei casi (Brissot & Edery 2017; De Bonis et al. 2022; Annoni et al. 2023). In genere, viene associata all'utilizzo intraoperatorio di colorante vitale, poiché non rimangono tracce della detezione del linfonodo sentinella in sede chirurgica (Brissot & Edery 2017; Ferrari et al. 2021b; De Bonis et al. 2022). De Bonis et al. riporta una discordanza tra linfonodo sentinella e regionale nel 26% dei casi, mentre nel 34% risulta parziale. I vasi linfatici risultano visibili nel 65% dei casi; si sottolinea che la visibilità dei vasi linfatici può essere compromessa da un errore nella tecnica di somministrazione oppure per la presenza di macro-metastasi in tali vasi (De Bonis et al. 2022).

Tra gli svantaggi di questa tecnica si possono identificare l'esposizione radiologica per le immagini radiografiche seriali, l'assenza di reperi intraoperatori, e i lievi-modesti effetti collaterali dovuti all'iniezione del contrasto, quali eritema e gonfiore fino a 10 gg dall'inoculo (Ferrari et al. 2018, 2021b).

Linfangiografia indiretta con tomografia computerizzata

La linfangiografia indiretta tomografica computerizzata è una tecnica che prevede l'iniezione peritumorale di un mezzo di contrasto iodato (olio etiodato, ioexolo, iomeprolo). Il linfonodo drena il mezzo di contrasto, quindi vengono eseguite scansioni tomografiche a differenti intervalli di tempo per individuare i linfonodi sentinella e i vasi linfatici relativi (Ferrari et al. 2021b; Wan et al. 2021; De Bonis et al. 2022).

Gli svantaggi di questa tecnica sono l'esposizione radiologica elevata, i lievi-modesti effetti collaterali nel sito di inoculo e i costi elevati (Ferrari et al. 2018, 2021b; De Bonis et al. 2022). Nonostante questo, ha numerosi vantaggi, tra cui l'ampia disponibilità, la capacità di tracciare con precisione il drenaggio linfatico e una buona risoluzione spaziale. Inoltre, non utilizza isotopi radioattivi e consente un'identificazione rapida del linfonodo sentinella grazie all'utilizzo di un mezzo di contrasto acquoso. È importante sottolineare che migliora l'identificazione del linfonodo sentinella perché scansiona tutto il corpo valutando anche possibili vie linfatiche inusuali (Grimes et al. 2017; Wan et al. 2021; Alvarez-Sanchez et al. 2023). Questi vantaggi giustificano la linfangiografia abbinata a radiologia o tomografia computerizzata come la metodica più utilizzata per la ricerca del linfonodo sentinella in medicina veterinaria (Marconato & Foglia 2021).

Anche questa tecnica deve essere associata all'utilizzo del colorante vitale poiché non permangono riferimenti intraoperatori per l'identificazione di tali linfonodi (Ferrari et al. 2021b).

In medicina veterinaria, la percentuale di identificazione del linfonodo sentinella è del 60-96,6% (Grimes et al. 2017; Rossi et al. 2018; Ferrari et al. 2021b; Wan et al. 2021).

Non esiste uno standard di esecuzione per tale tecnica diagnostica. Diversi autori concordano nell'effettuare una scansione iniziale senza contrasto, per poi posizionare l'animale nel modo migliore per il drenaggio linfatico della neoformazione, evitando compressioni del mastocitoma e del drenaggio linfatico regionale (Grimes et al. 2017; Soultani et al. 2017; Rossi et al. 2018; Ferrari et al. 2021b; Wan et al. 2021). Solo alcuni studi riportano l'utilizzo del contrasto endovenoso con scansione a 90 secondi dalla somministrazione oppure in fase arteriosa e venosa, al fine di valutare la neoformazione e l'operabilità (Rossi et al., 2018; Grimes et al., 2020; Randall et al., 2020). Successivamente, l'iniezione viene eseguita con mezzo di contrasto non ionico acquoso iodato, con ago da 25-27G, in quattro quadranti in zona peritumorale, nel sottocute oppure nello stesso tessuto di derivazione del mastocitoma secondo Sanchez et al. (Soultani et al. 2017; Rossi et al. 2018; Grimes et al. 2020; Randall et al. 2020; Alvarez-Sanchez et al. 2023). La quantità di contrasto iniettata deve essere suddivisa equamente nei quattro siti di iniezione. La sua quantità totale è differente nei vari studi; Rossi et al. utilizza quantità di contrasto dipendenti dal peso del paziente, ovvero 0,8-1,2-2 ml rispettivamente per pesi inferiori a 10 Kg, tra 10 e 20 Kg e maggiori di 20Kg (Rossi *et al.* 2018). Grimes et al., Randall et al. e Soultani et al. utilizzano 1 ml di contrasto indipendentemente dalle dimensioni della neoformazione e dal peso del paziente, mentre Sanchez et al. ne utilizza 2 ml (Soultani et al., 2017; Rossi et al., 2018; Grimes et al., 2020; Randall et al., 2020; Alvarez-Sanchez et al., 2023). In uno studio su tumori orali, gli autori utilizzano 1 e 2 ml alternati, concludendo che risulta più agevole l'utilizzo di volumi ridotti, eventualmente integrando un'altra somministrazione di farmaco se non si nota presa di contrasto durante le prime scansioni (Grimes *et al.* 2017). Appena dopo l'iniezione, è possibile massaggiare la zona per migliorarne il drenaggio linfatico, per circa 15-30 secondi (Alvarez-Sanchez *et al.* 2023; Rossi *et al.* 2018). Vengono quindi eseguite scansioni seriali a tempi stabiliti; anche in questo caso non ci sono standardizzazioni di metodica. Solitamente i tempi sono ravvicinati, essendo il contrasto acquoso e quindi a rapido drenaggio. Gli obiettivi principali che giustificano l'utilizzo di tempi ristretti sono l'esaminare con precisione l'intero percorso linfatico, ottenere una mappatura più accurata ed evitare il confondimento tra il linfonodo sentinella primario e un linfonodo di drenaggio secondario, che altrimenti potrebbe passare inosservato (Grimes et al., 2017). Le scansioni possono essere eseguite a 1, 3, 6, 9 e 12 minuti dalla fine dell'iniezione (Randall et al., 2020; Rossi et al., 2018). Altri articoli riportano la scansione immediata alla fine dell'iniezione, seguita da

scansioni a 1, 2 e 3 minuti, e ulteriormente ogni 2 minuti fino alla rilevazione di un linfonodo sentinella. Dopo la rilevazione, vengono eseguite scansioni a 1, 3 e 5 minuti per valutare la completa presa di contrasto (Grimes *et al.* 2020). Un altro articolo riporta scansioni a 1, 3, 5, 10 minuti. Se non si osserva presa di contrasto, si procede con l'iniezione di altri 2 ml di contrasto peritumorale in quattro nuovi quadranti, seguiti dal massaggio della zona per 15 secondi e scansioni a 15 e 20 minuti dalla prima somministrazione (Alvarez-Sanchez *et al.* 2023). Grimes *et al.* effettua scansioni alla fine dell'iniezione, poi ogni minuto successivo fino ad un massimo di 20 minuti o fino a quando non si osserva presa di contrasto (Grimes *et al.* 2020). È importante durante questa procedura non modificare il posizionamento del paziente (Soultani *et al.* 2017).

In uno studio effettuato su tumori mammari, è stata valutata l'omogeneità e l'eterogeneità di presa di contrasto, e il grado di attenuazione in Unità Hounsfield (HU). Si riporta che quasi la totalità di linfonodi non metastatici presenta una presa di contrasto omogenea probabilmente per l'assenza di macrometastasi che modificano l'architettura linfonodale, pur potendo presentare micrometastasi al loro interno. Quasi la totalità dei linfonodi metastatici si presentano eterogenei con differenti pattern (Soultani *et al.* 2017). È da ricordare che anche il non corretto posizionamento del paziente e l'ostruzione al drenaggio linfatico, oltre alla perdita di architettura linfonodale e all'infiltrazione di cellule neoplastiche, possono essere causa della minor presa di contrasto o del fallimento di tale metodica (Grimes *et al.* 2017; Soultani *et al.* 2017; Rossi *et al.* 2018).

Linfografia con colorante vitale

La linfografia con colorante vitale è una tecnica di mappatura linfonodale che necessita della dissezione di cute e tessuti circostanti al linfonodo per valutarne la presa di contrasto. Essa è principalmente utilizzata per aiutare il chirurgo nella ricerca del linfonodo interessato, precedentemente identificato come sentinella mediante tecniche di mapping; non può infatti essere utilizzata da sola poiché non permette di escludere altri linfonodi drenanti. Questa tecnica prevede l'utilizzo di colorante vitale (blu di metilene, blu di isosulfano, blu patentato V), iniettato nella zona peritumorale a 1-2 mm dai limiti della neoformazione, 5-15 minuti precedentemente all'incisione. Dopo aver inciso la cute e dissezionato il sottocute, è possibile visualizzare il linfonodo e/o il dotto grazie alla colorazione blu che li rende visibili. Una volta identificato si procede alla rimozione di tale linfonodo (Worley 2014; Ferrari *et al.* 2021b; Marconato & Foglia 2021; Ferrari *et al.* 2020; Guerra *et al.* 2022; Annoni *et al.* 2023).

La linfografia con colorante vitale è una tecnica economica, di facile applicazione, con rare reazioni locali rispetto alla medicina umana e ottimale per coadiuvare la chirurgia, riducendo i tempi di ricerca ed estrazione del linfonodo interessato. È importante ricordare che non sempre tale tecnica ha successo; infatti, si riporta una sensibilità del 77-89% e l'identificazione del linfonodo sentinella nell'84,6-96,6% dei casi (Worley 2014; Brissot & Edery 2017; Grimes et al. 2020). Risulta quindi fondamentale l'associazione con una tecnica di mapping preoperatoria (Grimes et al. 2020; Ferrari et al. 2021b).

La quantità di colorante utilizzato è differente nei diversi articoli, mentre la maggioranza degli autori concorda sull'utilizzo del blu di metilene alla concentrazione di 5mg/ml. Grimes et al., Randall et al. e Worley et al. utilizzano la stessa tecnica diluendo il colorante 1:10 con fisiologica sterile. Altri studi utilizzano 0,5-1 ml diviso nei quattro quadranti, inoculando negli stessi punti di iniezione peritumorale della diagnostica precedente; Brissot diluisce 1:1 il colorante con destrosio al 5% se il cane pesa meno di 10 Kg (Worley, 2012; Brissot & Edery, 2017; Ferrari et al., 2020; Grimes et al., 2020; Randall et al., 2020; Annoni et al., 2023).

Gli autori concordano nell'utilizzo congiunto di più tecniche per ottimizzare la mappatura del drenaggio linfatico e per una migliore identificazione del linfonodo sentinella. Si consiglia di associare tecniche preoperatorie e intraoperatorie. (Ferrari et al. 2017, 2020; Grimes et al. 2020; Marconato & Foglia 2021; Wan et al. 2021; De Bonis et al. 2022; Guerra et al. 2022; Alvarez-Sanchez et al. 2023).

3.6 TRATTAMENTO CHIRURGICO

Il trattamento chirurgico, in generale, prevede l'asportazione della neoformazione primaria, possibilmente con margini puliti e concomitante linfadenectomia (Blackwood et al., 2012; Hergt et al., 2016; Stefanello D. & Ferrari R., 2016; London & Thamm, 2020; Oliveira et al., 2020; Pecceu et al., 2020; De Nardi et al., 2022; Marconato et al., 2022).

La sola terapia chirurgica risulta curativa in caso di mastocitomi bene o mediamente differenziati con linfonodi esenti da metastasi. La chirurgia non è consigliata quando sono già presenti metastasi viscerali, poiché soggetti con mastocitomi di alto grado Kiupel o grado III Patnaik presentano prognosi peggiore nonostante la terapia chirurgica. In questo caso verrà definito un trattamento chemioterapico specifico (Romansik et al., 2007; Webster et al., 2007; Welle et al., 2008; MacNeill,

2011; O'Connell & Thomson, 2013; Stefanello D. & Ferrari R., 2016; Martins et al., 2021; London & Thamm, 2020; Pecceu et al., 2020; Rinaldi et al., 2022).

3.6.1 Tecnica chirurgica

Sono stati proposti differenti approcci di resezione chirurgica per il mastocitoma. L'approccio tradizionale identifica 3 cm di margine chirurgico e il piano fasciale come margine profondo, il quale non viene superato dalle metastasi e quindi definito come margine sicuro (London & Thamm 2020; Saunders *et al.* 2021). L'utilizzo di questo ampio margine laterale potrebbe portare alla scelta di non operabilità o di effettuare una chirurgia radicale (ad esempio amputazione) (Pratschke *et al.* 2013). Lo studio di Chu et al. condotto su cani con mastocitomi di basso grado, ha dimostrato che l'escissione completa è stata ottenuta nel 92% dei casi con un margine di 2 cm e nel 93% dei casi con un margine di 3 cm, ponendo attenzione sui risultati simili con marginalità ridotte (Chu *et al.* 2020).

Simpson et al. nel suo studio valuta l'infiltrazione tumorale nei margini di escissione, sia lateralmente con dimensioni di 1, 2 e 3 cm, che nel piano marginale profondo fasciale; lo studio prende in considerazione mastocitomi di grado I e II. Hanno concluso che il piano profondo può essere considerato sicuro per l'escissione a margini puliti. Il 100% dei mastocitomi di grado I sono stati rimossi con margini liberi utilizzando 1 o 2 cm di margine laterale. Il 65% dei mastocitomi di grado II aveva margini puliti con 1 cm di margine laterale e il 100% con 2 cm di margine laterale. Di conseguenza, Simpson et al. identifica un approccio metrico con l'applicazione di un margine laterale di 2 cm come sicuro per ottenere l'escissione a margini non infiltrati della neoformazione, indipendentemente dalle dimensioni del tumore (Simpson *et al.* 2004). Sulla base di questo, Fulcher et al. ha utilizzato un margine chirurgico di 2 cm per tutti i mastocitomi in studio (gradi I e II), raggiungendo una percentuale del 91% di escissione completa di mastocitomi (Fulcher *et al.* 2006). Anni dopo, Pratschke et al. applica un approccio proporzionale, con margine di escissione equivalente al diametro maggiore della neoformazione, fino alla dimensione di 4 cm, oltre la quale viene fissato il margine massimo di 4 cm, comprendendo sempre la rimozione del piano fasciale profondo. Questo comporta l'escissione completa nell'85% dei casi in studio, includendo mastocitomi di grado I, II e III Patnaik e alto e basso grado Kiupel (Pratschke *et al.* 2013). Saunders et al. propone un approccio proporzionale modificato, definendo il margine massimo a 2 cm, riportando comunque l'escissione completa nel 95% dei casi e una recidiva del 3%, comprendendo

tumori di basso e alto grado. Questo approccio riporta risultati comparabili alle tecniche precedenti (Saunders *et al.* 2021).

Ad oggi, è di comune accordo l'essenzialità della rimozione del piano fasciale profondo per ottenere il margine profondo non infiltrato, mentre il margine laterale deve essere stabilito tenendo conto delle dimensioni del tumore primario, della regione anatomica e del grading citologico. Di conseguenza, si raccomanda di utilizzare un margine proporzionale fino a tumori di 2 cm, evitando di andare al di sotto dei 5 mm come margine minimo. Per tumori di 2-4 cm il margine laterale deve essere di 2-3cm. Nel caso in cui le dimensioni del tumore superino i 4 cm o mostrino caratteristiche clinicamente o istologicamente più aggressive, si dovrebbe considerare un margine di almeno 3 cm, eventualmente associato a terapie aggiuntive (Blackwood *et al.* 2012; Oliveira *et al.* 2020; De Nardi *et al.* 2022; Marconato *et al.* 2022b).

Nei casi di neoformazioni di difficile operabilità per posizione o dimensione, è possibile effettuare terapie neo-adiuvanti citoreduttive per rendere il tumore aggredibile chirurgicamente, successivamente esciso con margine più ampio possibile (Marconato *et al.* 2022b).

3.6.2 Recidiva e margini chirurgici

La recidiva è la ricomparsa del tumore entro i 2 cm dalla precedente sede anatomica, dopo terapia chirurgica, chemioterapia o radioterapia (Miller 1995; Kiupel *et al.* 2011; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Horta *et al.* 2018; Marconato *et al.* 2022a). La comparsa di recidiva è associata a prognosi negativa in mastocitomi di alto grado, spesso legata a diffusione metastatica, con un tasso di mortalità correlato al tumore del 62-100%, rispetto al 18,5-19% dei casi esenti da recidive (Preziosi *et al.*, 2004; Welle *et al.*, 2008; Stefanello *et al.*, 2009; O'Connell & Thomson, 2013; Stefanello D. & Ferrari R., 2016; Horta *et al.*, 2018; Gill *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2021; Marconato *et al.*, 2022;). È quindi evidente l'importanza di una chirurgia aggressiva al fine di ottenere margini non infiltrati, per assicurare una migliore prognosi a lungo termine e un migliore outcome clinico, soprattutto in mastocitomi di alto grado (Forte *et al.* 2006; Welle *et al.* 2008; Stefanello *et al.* 2009; Camus *et al.* 2016; London & Thamm 2020; Ribeiro *et al.* 2022). A sostegno di questo si riportano aumenti nel tasso di recidiva dopo l'asportazione a margini incompleti dell'8-23% rispetto a exeresi con margini completi (7-9%) (Gill *et al.* 2020; Guerra *et al.* 2022). Inoltre, mastocitomi con margini incompleti hanno una probabilità 2,5 volte più alta di giungere a morte rispetto a mastocitomi escisi marginalmente, che a loro volta hanno 2,5 volte il rischio maggiore rispetto a MCT con margini

puliti; il margine non pulito incrementa la probabilità di sviluppare un fenotipo aggressivo. (Camus *et al.* 2016; Gill *et al.* 2020; Ribeiro *et al.* 2022)

È da evidenziare come nei mastocitomi di basso grado non vi sia correlazione tra recidiva e margini di escissione; al contrario, mastocitomi di alto grado presentano una possibile recidiva nel 36-40% dei casi, anche quando escissi con margini completi (Saunders *et al.* 2021; De Nardi *et al.* 2022).

3.6.3 Linfadenectomia

Vari studi definiscono approcci differenti alla linfadenectomia. Alcuni studi riportano la rimozione di tutti i linfonodi presenti nel linfocentro drenante, con rimozione sia dei linfonodi sentinella che dei regionali per migliorare la detezione delle micrometastasi (Brissot & Edery 2017; Grimes *et al.* 2020; Alvarez-Sanchez *et al.* 2023). Un altro studio ha raccomandato la linfadenectomia solo per i linfonodi che presentano anomalie o che sono positivi per metastasi o probabilmente metastatici (Baginski *et al.* 2014). Alcuni autori concordano nell'effettuare in ogni caso la linfadenectomia del linfonodo sentinella o, se non mappato, del regionale drenante (Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Guerra *et al.* 2022). Si raccomanda la rimozione del linfonodo sentinella prima del tumore primario, per ridurre il rischio di diffusione delle cellule tumorali durante la chirurgia (Guerra *et al.* 2022; Marconato *et al.* 2022b).

3.7 ISTOLOGIA DEL MASTOCITOMA

Mentre la diagnosi citologica di mastocitoma non dimostra completa affidabilità prognostica (Scarpa *et al.* 2016; Stefanello D. & Ferrari R. 2016), la diagnosi istologica è il metodo diagnostico definitivo (Murphy *et al.*, 2006; Romansik *et al.*, 2007; Welle *et al.*, 2008; Sabattini *et al.*, 2015; Stefanello *et al.*, 2015; Stefanello D. & Ferrari R., 2016; Hergt *et al.*, 2016; Scarpa *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2020; London & Thamm, 2020; Oliveira *et al.*, 2020; Avallone *et al.*, 2021; Martins *et al.*, 2021; Willmann *et al.*, 2021; De Nardi *et al.*, 2022; Guerra *et al.*, 2022; Rinaldi *et al.*, 2022).

La prima classificazione proposta da Bostock nel 1973 prevedeva la suddivisione dei mastocitomi in tre classi: grado I, considerato di alto grado, grado II, considerato intermedio, e grado III, considerato di basso grado. I mastocitomi indifferenziati presentavano tempi di sopravvivenza molto ridotti rispetto ai gradi II e III, i quali tra loro non mostravano differenze significative. Tuttavia,

questa classificazione non è più in uso (Bostock, 1973; Misdorp, 2004; Kiupel et al., 2011; Willmann et al., 2021)(Tabella 7).

Diagnosi istologica	Descrizione
Grado I (poco/non differenziato)	Elevata cellularità; limiti citoplasmatici non ben definiti; pleomorfismo nucleare; mitosi frequenti; granuli citoplasmatici sparsi.
Grado II (mediamente differenziato)	Gruppi di cellule con ben visibili i limiti citoplasmatici; ridotto rapporto nucleo/citoplasma; maggiore granulazione citoplasmatica
Grado III (ben differenziato)	Limiti citoplasmatici ben definiti; nucleo sferico o ovoidale, senza pleomorfismo nucleare; mitosi rare o assenti; granuli grandi, ben visibili e numerosi

Tabella 7 – classificazione istologica del mastocitoma cutaneo canino Bostock (Bostock et al. 1973)

La successiva classificazione a tre livelli ideata da Patnaik et al. prende in considerazione morfologia, cellularità, indice mitotico, infiltrazione nei tessuti e reazione stromale per stabilire il grado istologico (Patnaik et al., 1984; Kiupel et al., 2011; Sabattini et al., 2015; Stefanello et al., 2015; Camus et al., 2016; Hergt et al., 2016; Horta et al., 2018; Cruz et al., 2020; Avallone et al., 2021; Berlato et al., 2021; Willmann et al., 2021; De Nardi et al., 2022)(Tabella 8).

Un problema rilevante relativo a questa classificazione è rappresentato dalla soggettività interpretativa dei criteri considerati, che portano a includere oltre il 40% dei mastocitomi nel grado II, raggruppando tumori con diversi comportamenti biologici (Patnaik et al., 1984; Misdorp, 2004; Welle et al., 2008; Kiupel et al., 2011; Stefanello et al., 2015; Camus et al., 2016; Scarpa et al., 2016; Horta et al., 2018; London & Thamm, 2020; Avallone et al., 2021; Berlato et al., 2021; Willmann et al., 2021; De Nardi et al., 2022; Rinaldi et al., 2022). Infatti, la concordanza tra patologi utilizzando questa classificazione risulta del 62,1-72,9%; specificatamente per le varie classi, raggiunge il 63.1% per il grado I, il 63% per il grado II e il 74,6% per il grado III (Misdorp 2004; Kiupel et al. 2011).

Diagnosi istologica	Descrizione
Grado I (basso)	Limitata al derma e spazi interfollicolari, non presente invasione dei tessuti circostanti
	Mastociti rotondi, ben differenziati, con citoplasma ampio e granuli di medie dimensioni, disposte in file o in piccoli gruppi separate da fibre di collagene dermico mature
	Nuclei rotondi, con cromatina condensata
	Non presenti figure mitotiche
	Minimo edema e necrosi, minima reazione stromale
Grado II (intermedio)	Infiltrazione di derma e sottocute, possibile fino a muscoli e tessuti circostanti
	Mastociti moderatamente pleomorfi, rotondi o ovali, disposti a gruppi intercalati da sottile stroma fibrovascolare. Citoplasma più o meno delimitato, con granuli piccoli o grandi, iper o ipocromatici. Possibili cellule grandi, fuse, sparse.
	Nuclei tondi con cromatina sparsa e nucleoli singoli. Possibile binucleazione.
	Mitosi da 0 a 2 per HPF
	Aree di edema e necrosi, ialinizzazione del collagene
Grado III (alto)	Sostituzione da parte di cellule neoplastiche di sottocute e tessuti profondi
	Mastociti pleomorfi, citoplasma indistinto con granuli molto piccoli o assenti (ipocromatici), in fogli stretti e compatti, intercalati da stroma fibrovascolare oppure fibrocollagenoso spesso con aree di ialinizzazione Molte cellule grandi, fuse, sparse
	Nuclei indentati o rotondi, con uno o più nucleoli evidenti. Frequente binucleazione
	Mitosi da 3 a 6 per HPF
	Comune edema, necrosi, ialinizzazione del collagene, emorragie

Tabella 8 – Classificazione istologica a 3 livelli del mastocitoma cutaneo canino secondo Patnaik (Patnaik et al. 1984)

I mastocitomi di grado I o ben differenziati, generalmente presentano una bassa incidenza di metastasi (<10%); di conseguenza, vengono considerati meno aggressivi e spesso sono curati tramite escissione chirurgica, con un tasso di sopravvivenza a lungo termine dell'80-90% e una mortalità associata al tumore pari a zero. Al contrario, i mastocitomi di grado III, o scarsamente/non differenziati, mostrano un esito prognostico infausto caratterizzato da recidive ed una probabilità elevata di sviluppare metastasi (tra il 55% e il 96%) delle quali 46,5% linfonodali. Questi tumori sono classificati come maggiormente maligni, con una percentuale di mortalità associata al tumore che raggiunge il 67%. I mastocitomi di grado II, o di grado intermedio, manifestano un comportamento biologico variabile. Circa l'80% di essi presenta una progressione benigna, mentre il rimanente 20% rivela un comportamento aggressivo; questa categoria presenta un potenziale metastatico compreso tra il 5% e il 22%. La sopravvivenza a lungo termine dopo l'intervento chirurgico è osservata nel 75% dei casi, mentre la mortalità correlata al tumore si manifesta nel 17-56% dei casi (Bostock, 1973; Murphy et al., 2006; Romansik et al., 2007; Stefanello et al., 2009; Book et al., 2011; O'Connell & Thomson, 2013; Sabattini et al., 2015; Stefanello et al., 2015; Hergt et al., 2016; Scarpa et al., 2016; Horta et al., 2018; Gill et al., 2020; London & Thamm, 2020; Avallone et al., 2021; Berlato et al., 2021; Martins et al., 2021; De Nardi et al., 2022; Ribeiro et al., 2022; Rinaldi et al., 2022). Inoltre, non sono state riscontrate differenze significative nella frequenza di metastasi linfonodali tra il grado I e II secondo la classificazione di Patnaik (Krick *et al.* 2009; Rinaldi *et al.* 2022).

Il sistema di classificazione a due livelli proposto da Kiupel et al. dimostra una maggiore coerenza tra i patologi e maggiore predittività riguardo prognosi e sopravvivenza rispetto alla metodologia di classificazione di Patnaik et al. (Misdorp, 2004; Kiupel et al., 2011; Baginski et al., 2014; Sabattini et al., 2015; Stefanello et al., 2015; Hergt et al., 2016; Horta et al., 2018; Berlato et al., 2021; Willmann et al., 2021; De Nardi et al., 2022; Marconato et al., 2022a) (Tabella 9). I mastocitomi di alto grado riportano un aumento di mortalità 53,8 volte superiore rispetto ai mastocitomi di basso grado, e la probabilità del 30,8-37,5% di sviluppare ulteriori tumori, mentre questa probabilità si riduce all'8,9-14,9% nei casi di tumori di basso grado (Kiupel et al. 2011; Camus et al. 2016; Berlato et al. 2021). L'alto grado presenta maggior tasso metastatico (30,8%) col 29,7% di metastasi linfonodali rispetto al basso grado (Book et al., 2011; Kiupel et al., 2011; Sabattini et al., 2015; Camus et al., 2016; Stefanello D. & Ferrari R., 2016; Cruz et al., 2020; London & Thamm, 2020; Berlato et al., 2021; Willmann et al., 2021; De Nardi et al., 2022; Ribeiro et al., 2022).

La concordanza tra patologi utilizzando questa classificazione è del 96,8%; in particolare, vi è un accordo nell'identificare il basso grado nel 79,3% dei casi e l'alto grado nel 76,5% dei casi (Kiupel et al. 2011; Sabattini et al. 2015; Camus et al. 2016; Berlato et al. 2021; De Nardi et al. 2022; Rinaldi et al. 2022).

La classificazione utilizza criteri oggettivi e quantitativi allo scopo di ridurre l'ambiguità nei confronti dei tumori di grado II e di identificare con maggiore precisione i mastocitomi con comportamento biologico aggressivo (Kiupel et al. 2011; Sabattini et al. 2015; Scarpa et al. 2016; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Berlato et al. 2021).

L'alto grado è determinato da almeno una delle seguenti caratteristiche: almeno 7 mitosi/10 HPF, almeno 3 multinucleate (3 o più nuclei)/10 HPF, almeno 3 nuclei bizzarri/10 HPF, cariomegalia (diametro di almeno il 10% delle cellule neoplastiche con un nucleo almeno due volte più grande di un nucleo normale) (Kiupel et al. 2011; Stefanello et al. 2015; Hergt et al. 2016; Scarpa et al. 2016; De Nardi et al. 2022).

Sono state riportate frequenze di rilevazione di mastocitomi di basso grado nel 67,1-88% e di alto grado nell'11,2-32,9% (Camus et al. 2016; Hergt et al. 2016; Scarpa et al. 2016; Śmiech et al. 2017; Horta et al. 2018).

Basso grado	Alto grado
<i>È sufficiente la presenza di un singolo criterio di alto grado per definirlo come tale</i>	
< 7 mitosi/10 HPF	≥ 7 mitosi/10 HPF
< 3 cellule multinucleate/10 HPF	≥ 3 cellule multinucleate/10 HPF
< 3 nuclei bizzarri/10 HPF	≥ 3 nuclei bizzarri/10 HPF
< 10% di cellule con cariomegalia	≥ 10% di cellule con cariomegalia

Tabella 9 - Classificazione istologica a 2 livelli del mastocitoma cutaneo canino secondo Kiupel et al., 2011.

L'indice mitotico ha un ruolo prognostico importante; sebbene non sia correlato al tasso di recidiva, valori elevati sono indicativi di un comportamento biologico più aggressivo del tumore. Sono stati proposti diversi cut off. Il più utilizzato è l'indice mitotico >5 figure mitotiche/HPF il quale sembra essere associato a maggiore rischio di mortalità (Romansik et al. 2007; MacNeill 2011; Horta et al. 2018; Moore et al. 2020; Berlato et al. 2021; Ribeiro et al. 2022; Cino et al., 2023).

L'attuale approccio, proposto dall'American College of Veterinary Pathologists e da Veterinary Cancer Society, prevede l'utilizzo combinato delle classificazioni di Patnaik e Kiupel per la diagnosi del mastocitoma, al fine di aumentare l'accordo tra i patologi e potenzialmente validare un metodo diagnostico unificato (Cruz et al., 2020; Oliveira et al., 2020; Berlato et al., 2021; De Nardi et al., 2022; Marconato et al., 2022b; Rinaldi et al., 2022) (Tabella 10).

Diagnosi istologica Patnaik/Kiupel	Descrizione
Grado I/basso	Prognosi eccellente; Assenti morti correlate al tumore; Metastasi linfonodali 6%; Metastasi a distanza 2%; <i>(Importante stadiazione anche in questo gruppo)</i>
Grado II/basso	Prognosi buona; Morti correlate al mct 3-17%; Sopravvivenza entro l'anno 94%; Metastasi linfonodali 16%; Metastasi a distanza 2%;
Grado II/alto	Prognosi discreta; Morti correlate al mct del 14-56%; Sopravvivenza entro l'anno 46%; Metastasi linfonodali 15%; Metastasi a distanza 2%:
Grado III/alto	Prognosi scarsa; Morti correlate al mct 67-75%; Metastasi linfonodali 46%; Metastasi a distanza 21%;

Tabella 10 - Classificazione istologica del mastocitoma canino Kiupel-Patnaik proposto da dall'American College of Veterinary Pathologists e da Veterinary Cancer Society (Berlato et al. 2021).

Questo approccio consente di distinguere tra tumori classificati nel grado II, mastocitomi che in realtà presentano una prognosi più favorevole e a lungo termine (79-92%) da quelli che mostrano un comportamento più aggressivo (8-21%) (Sabattini et al., 2015; Marconato et al., 2022a). Inoltre,

emerge che i tumori classificati come di basso grado secondo il sistema Kiupel dimostrano sempre un comportamento biologico meno aggressivo, indipendentemente dal fatto che vengano classificati come grado I o II secondo il sistema Patnaik. D'altra parte, i tumori classificati come di alto grado secondo Kiupel presentano differenze nel comportamento a seconda che siano classificati come grado II o III secondo il sistema Patnaik (Sabattini *et al.* 2015).

La frequenza di metastasi linfonodali varia in base al grado tumorale: dal 18% nei casi a basso grado al 55-96% nei casi ad alto grado (Krick *et al.* 2009; Rinaldi *et al.* 2022)

La classificazione a due livelli consente quindi di definire meglio la prognosi dei mastocitomi di grado II, mentre il sistema a tre livelli potrebbe suddividere il livello di aggressività dei mastocitomi alto grado (Marconato *et al.*, 2022a).

Per questo motivo, quando usati insieme, suddividono i mastocitomi in quattro diverse categorie: grado I/basso, grado II/basso, grado II/alto, grado III/alto, con comportamenti biologici e caratteristiche istologiche differenti (Horta *et al.*, 2018; Berlato *et al.*, 2021; Marconato *et al.*, 2022a).

Questi dati sottolineano l'importanza dell'utilizzo combinato dei due sistemi di classificazione istopatologica per ottenere una valutazione accurata dell'esito clinico, della sopravvivenza e della prognosi. Inoltre, evidenziano l'importanza di includere fattori prognostici nella valutazione del comportamento biologico del tumore in relazione al grado istologico (Stefanello *et al.* 2015; Horta *et al.* 2018; Berlato *et al.* 2021; Marconato *et al.* 2022b).

3.7.1 Immunoistochimica

L'immunoistochimica è una tecnica utile per l'analisi dei marker utilizzati per classificare i mastocitomi e per predire in modo più accurato il loro comportamento biologico. Tra i vari anticorpi utilizzati, solo pochi hanno un reale valore prognostico, con particolare attenzione a Ki-67 e KIT (De Nardi *et al.*, 2022). L'impiego dell'immunoistochimica per la ricerca di KITr è utilizzato per identificare i mastocitomi indifferenziati avendone un'alta espressione, a contrario dei ben differenziati che invece ne hanno una bassa espressione. Tuttavia, questa espressione non è direttamente correlata al grado tumorale. Il pattern immunoistochimico di questa proteina è considerato l'indice più oggettivo e affidabile, e ha un forte valore prognostico riguardo alla recidiva e alla sopravvivenza (Kiupel *et al.*, 2004; Preziosi *et al.*, 2004; Willmann *et al.*, 2021). Per valutare

l'espressione della proteina KIT, viene utilizzato l'anticorpo CD117 sui campioni istologici (Marconato et al., 2022b).

Esistono tre pattern di colorazione immunohistochimica: KIT pattern I, che è membranoso (con colorazione predominante nella membrana cellulare e poco o nessuna nel citoplasma), KIT pattern II, caratterizzato da una colorazione intensa e punteggiata nel citoplasma, e KIT pattern III, che mostra una colorazione diffusa in tutto il citoplasma. Il KIT pattern I è presente nel 42,9% dei casi, il pattern II nel 43,9%, e il pattern III nel 55%. I pattern II e III, con la presenza di KIT nel citoplasma, sono associati a una maggiore probabilità di recidiva, a un tempo di sopravvivenza più breve e a una prognosi meno favorevole; un aumento dell'espressione di KIT è un forte indicatore di recidiva e di una sopravvivenza ridotta. Il KIT pattern I è associato a una recidiva nel 2,4% dei casi, mentre i pattern II e III presentano recidiva nel 14-23,1% dei tumori. Inoltre, il KIT pattern I ha una mortalità correlata al mastocitoma del 2,4%, mentre il pattern II e III del 25,6-38,5% (Kiupel et al. 2004; Preziosi et al. 2004; Horta et al. 2018; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022b). In uno studio, tutti i mastocitomi metastatici erano positivi per KIT, di cui il 59% aveva il pattern III e il 41% il pattern II, mentre il pattern I non era associato a metastasi (Ribeiro et al., 2022).

L'antigene Ki67 è espresso in tutte le fasi del ciclo cellulare, ad eccezione della fase G0. La sua espressione aumenta durante la proliferazione cellulare attiva, motivo per cui il numero relativo di cellule positive a Ki67 viene utilizzato come indice di proliferazione. È stato osservato che un aumento dell'espressione di Ki67 è strettamente associato a un aumento della mortalità legata al tumore, della frequenza di recidive e metastasi, nonché all'aumento dell'incidenza di mastocitomi. Questo è un importante fattore predittivo di un comportamento biologico più aggressivo del tumore, con conseguente riduzione del tempo di sopravvivenza e peggioramento dell'outcome clinico (Romansik et al., 2007; Webster et al., 2007; Welle et al., 2008; Stefanello D. & Ferrari R., 2016; Horta et al., 2018; Willmann et al., 2021; De Nardi et al., 2022; Marconato et al., 2022a).

Esistono differenti valori di soglia per il Ki67. Il $Ki67 \geq 10,6$ è stato dimostrato associato ad una maggiore mortalità, mentre il cut-off a 1,8% è confermato come associato a prognosi peggiore per cani con mastocitoma di grado II secondo Patnaik. Inoltre, si riporta una bassa probabilità di recidiva in mastocitomi di grado 2P con $Ki67 < 23$ cellule positive/HPF (Scase et al., 2006; Maglennon et al., 2008; Vascellari et al., 2013; Cino et al., 2023). Nonostante questo, in un articolo più recente, non sono stati osservati eventi negativi in animali con mastocitomi con Ki67 mediano

di 3,5%. Di conseguenza, questo studio suggerisce che l'indice Ki67 non ha un impatto prognostico nei cMCT di grado intermedio secondo Patnaik e basso secondo Kiupel (2P/LK) con linfonodi precocemente metastatici secondo Weishaar (HN2) e che i valori di Ki67 potrebbero non essere utili nella valutazione di mastocitomi cutanei di grado 2P, in contrasto con quanto detto in studi precedenti (Cino et al. 2023).

3.7.2 Indagini molecolari

Le mutazioni del gene c-kit e duplicazioni interne dello stesso sembrano associate a prognosi negativa, spesso correlate a comportamento biologico aggressivo, ritrovate con una maggiore frequenza in mastocitomi poco differenziati o di alto grado. I mastocitomi con queste mutazioni presentano un rischio di recidiva e metastasi due volte maggiore rispetto a quelli senza mutazioni. Questo si traduce in una riduzione del tempo complessivo di sopravvivenza e in un tasso più elevato di morti correlate al tumore, le quali nel 69% dei casi sono dovute a mastocitomi con mutazioni (Downing et al., 2002; Misdorp, 2004; Thompson et al., 2011; Stefanello D. & Ferrari R., 2016; Cruz et al., 2020; London & Thamm, 2020; De Nardi et al., 2022; Marconato et al., 2022a; Ribeiro et al., 2022; Tamlin et al., 2022).

Le mutazioni degli esoni 11 e 12 del gene c-kit sono riscontrate nell'8% dei mastocitomi di grado I, nel 35% di quelli di grado II e nel 35% di quelli di grado III (Downing et al., 2002). In particolare, la mutazione nell'esone 11 è presente nel 10,7% dei mastocitomi cutanei, di cui il 30-50% appartiene ai gradi II e III; questo conferma l'associazione tra queste mutazioni e la maggiore aggressività tumorale (Downing et al. 2002; Zavodovskaya et al. 2004; Horta et al. 2018; Willmann et al. 2021). Nonostante lo screening genetico delle mutazioni di c-kit non sia una pratica routinaria, è fortemente raccomandato per la sua rilevanza clinica. Questo è particolarmente importante quando si considera il trattamento del paziente con inibitori delle tirosin-chinasi (TKI), poiché questi farmaci possono essere altamente efficaci nei casi di mastocitomi con mutazioni di c-kit; è inoltre consigliato in caso ci siano fattori prognostici che indicano un aumento del rischio di metastasi o recidiva (Horta et al., 2018; Willmann et al., 2021). Per esempio, l'analisi del gene c-kit viene eseguita su mastocitomi di alto grado o su quelli con uno o più linfonodi regionali metastatici.

Nel caso di mastocitomi di basso grado ulcerati, di dimensioni superiori a 3 centimetri, con margini di escissione infiltrati o esigui, o se non è stata effettuata la linfadenectomia, è possibile valutare i livelli di espressione di Ki67 e KIT. Questi marker diventano utili in quanto se i valori superano rispettivamente 23 cellule positive/HPF per Ki67 e il mastocitoma mostra un KIT pattern II o III, allora si considera l'opportunità di somministrare terapie adiuvanti per migliorare la prognosi (Marconato et al., 2022a).

3.8 ISTOLOGIA LINFONODALE

L'istologia linfonodale è considerata il gold standard per la rilevazione di metastasi (Worley 2012; Marconato & Foglia 2021; Willmann et al. 2021). Per assicurare la migliore esamezione dell'organo, il linfonodo deve essere asportato per intero; è sconsigliata la biopsia per la parzialità del campione ottenuto che potrebbe condurre ad una diagnosi errata (Berlato et al. 2021; Marconato & Foglia 2021; De Nardi et al. 2022).

La classificazione tutt'oggi utilizzata è quella ideata da Weishaar et al. nel 2014, che definisce quattro classi (HN0-HN3) in base a caratteristiche istologiche oggettive, quali numero e distribuzione dei mastociti nonché la compromissione dell'architettura linfonodale (Blackwood et al. 2012; Weishaar et al. 2014; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; London & Thamm 2020; Guerra et al. 2022) (Tabella 11). Queste classi risultano correlate all'outcome clinico.

Classificazione istologica	Criteri istopatologici	Interpretazione
HN0	Mastociti assenti o rari, isolati, nei seni linfonodali e/o nel parenchima per campo a 400x, oppure non soddisfa le caratteristiche sottostanti	Non metastatico
HN1	Più di tre mastociti isolati nei seni e/o nel parenchima linfonodale in almeno quattro campi a 400x	Pre-metastatico
HN2	Aggregati o foglietti di mastociti da almeno tre cellule ognuno, nei seni e/o nel parenchima linfonodale o	Metastasi precoce
HN3	Alterazione o distruzione dell'architettura linfonodale normale da parte di foci, noduli, figli o cluster evidenti di mastociti	Metastasi certa

Tabella 11 – classificazione istopatologica linfonodale secondo Weishaar et al. 2014.

La presenza di metastasi linfonodali HN2 o HN3 è un fattore prognostico negativo, con peggiore outcome clinico, riduzione dell'intervallo libero da malattia e riduzione della sopravvivenza rispetto a linfonodi HN0 e HN1 (Baginski et al., 2014; Warland et al., 2014; Weishaar et al., 2014; Stefanello D. & Ferrari R., 2016; Guerra et al., 2022; Marconato et al., 2022a; Ribeiro et al., 2022). Tuttavia, quando i linfonodi metastatici vengono rimossi e la terapia chirurgica è affiancata da radioterapia o chemioterapia, si osserva comunque una prognosi favorevole nei casi di mastocitomi moderatamente differenziati (Baginski et al. 2014; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Guerra et al. 2022). Nel caso di mastocitomi scarsamente differenziati, la presenza di metastasi linfonodali riduce la sopravvivenza di quasi tre volte rispetto ai casi senza metastasi, ma il trattamento diretto dei linfonodi metastatici può aumentare la sopravvivenza rispetto ai casi non trattati (London & Thamm, 2020).

3.9 TERAPIA MEDICA

Il trattamento chirurgico è la terapia d'elezione per i mastocitomi ed è dimostrato curativo nei tumori di basso grado. Tuttavia, per i mastocitomi di grado più elevato o che hanno metastatizzato, è spesso necessario un approccio terapeutico combinato che includa, oltre alla chirurgia, trattamenti medici come la chemioterapia e la radioterapia (Misdorp, 2004; Blackwood et al., 2012; London & Thamm, 2020; Oliveira et al., 2020; De Nardi et al., 2022; Guerra et al., 2022; Marconato et al., 2022). La decisione sul trattamento da adottare per un cane con un mastocitoma dipende da vari fattori, tra cui il grado del tumore, la sua localizzazione, le condizioni generali del cane e le preferenze del proprietario (Misdorp 2004; Blackwood et al. 2012; Garrett 2014; London & Thamm 2020).

3.9.1 Chemioterapia

La chemioterapia può essere un'opzione di trattamento efficace per i mastocitomi canini metastatici, ma risulta importante discutere dei potenziali benefici e rischi con il proprietario prima di intraprendere questo percorso terapeutico (Garrett 2014; London & Thamm 2020). La chemioterapia adiuvante è consigliata nei pazienti con tumori di grado III o alto Kiupel, o mastocitomi di grado II con alti indici proliferativi e metastasi linfonodali (Baginski et al., 2014; London & Thamm, 2020; Marconato et al., 2020; Oliveira et al., 2020; Guerra et al., 2022).

L'efficacia di questo trattamento riporta migliore prognosi e riduzione delle dimensioni del tumore. In un articolo, la risposta completa al trattamento è dimostrata nel 30-50% dei casi (Oliveira *et al.* 2020).

La chemioterapia può avere differenti obiettivi. Essa può essere neoadiuvante, adiuvante o palliativa (Oliveira *et al.* 2020; Marconato *et al.* 2022b). La chemioterapia neoadiuvante viene eseguita precedentemente alla chirurgia al fine di citoreducere la neoformazione. Viene quindi effettuata su mastocitomi difficilmente aggredibili chirurgicamente per la dimensione o per la posizione degli stessi. La chemioterapia adiuvante viene eseguita successivamente alla rimozione di neoformazione e linfonodi. I soggetti selezionati sono mastocitomi di alto grado Kiupel o di grado III Patnaik, oppure in caso di metastasi linfonodali HN3, o ancora quando sono presenti metastasi a distanza. Per mastocitomi asportati con margini infiltrati, la terapia locale risulta migliore della terapia sistemica (Marconato *et al.* 2022b). La chemioterapia palliativa è di scelta in soggetti con malattia in stadio avanzato oppure non operabili. Il fine di questo tipo di chemioterapia è di controllare la malattia e la sintomatologia, rallentandone la progressione (De Nardi *et al.* 2022).

Non esiste un protocollo univoco per il trattamento chemioterapico del mastocitoma. I protocolli utilizzati prevedono l'utilizzo di più farmaci associati tra loro per una risposta migliore al trattamento, scelti sulla base del paziente e del tipo di tumore (Garrett 2014; De Nardi *et al.* 2022; Marconato *et al.* 2022b). I farmaci utilizzati sono prednisone, vinblastina, ciclofosfamide, lomustina, toceranib, clorambucile. Inoltre, è possibile utilizzare gli inibitori tirosin-chinasici (toceranib e imatinib), che consentono un'associazione con gli altri farmaci efficace e sicura, inoltre risultano specifici per mastocitomi presentanti mutazioni KIT (De Nardi *et al.* 2022; Garrett 2014).

Le linee guida SIONCOV consigliano un iter terapeutico in base ai gradi istologico tumorale e metastatico linfonodale, in base anche agli esiti di analisi immunoistochimiche e molecolari aggiuntive (Marconato, 2020; Marconato *et al.*, 2022) (Tabella 12).

	HN0-HN1-HN2	HN3	Non conosciuto
Basso/I-II, margini puliti	Chirurgia curativa, no terapie adiuvanti	Chemioterapia o inibitori tirosin-chinasi sulla base di analisi mutazionale (c-kit) e immunoistochimica (KIT e pattern)	Citologia linfonodale o linfadenectomia prima di procedere con terapie adiuvanti oppure eseguire immunoistochimica (AgNOR, Ki67 e KIT Pattern) e esame mutazionale (c-kit)
Basso/I-II, margini infiltrati	Indagini immunoistochimiche (AgNOR, Ki67, pattern KIT) per procedere con terapie adiuvanti (seconda chirurgia, radioterapia)	Chemioterapia o inibitori tirosin-chinasi sulla base dell'analisi mutazionale (c-kit)	Citologia linfonodale o linfadenectomia prima di procedere con terapie adiuvanti oppure eseguire immunoistochimica (AgNOR, Ki67 e KIT Pattern)
Alto/III, margini puliti	Possibile chemioterapia o inibitori tirosin-chinasi (c-kit)	Chemioterapia o inibitori tirosin-chinasi sulla base dell'analisi mutazionale (c-kit)	Linfadenectomia e chemioterapia o inibitori tirosin-chinasi sulla base dell'analisi mutazionale (c-kit)
Alto/III, margini infiltrati	Chemioterapia o inibitori tirosin-chinasi sulla base dell'analisi mutazionale (c-kit)	Chemioterapia o inibitori tirosin-chinasi sulla base dell'analisi mutazionale (c-kit)	Linfadenectomia e chemioterapia o inibitori tirosin-chinasi sulla base dell'analisi mutazionale (c-kit)

Tabella 12 - Linee guida per il trattamento del mastocitoma cutaneo canino (Marconato 2020)

3.9.2 Radioterapia

La radioterapia è una terapia locale efficace e sicura per il trattamento dei mastocitomi canini. La radioterapia può essere una valida opzione di trattamento per i cani con mastocitomi inoperabili o con prognosi infausta. In particolare, viene utilizzata quando non è possibile aggredire chirurgicamente il tumore o quando è stato rimosso ma in modo incompleto. Inoltre, è possibile utilizzarla in soggetti con un alto rischio di recidiva, ad esempio con mastocitomi di alto grado Kiupel o di grado III Patnaik, oppure in mastocitomi con indici proliferativi aumentati. La radioterapia è stata dimostrata efficace nel ridurre il tumore e migliorare la prognosi dei cani con mastocitomi. I tassi di risposta completa sono stati riportati nel 66-75% dei casi (Oliveira *et al.* 2020).

La radioterapia può essere utilizzata come terapia unica, adiuvante o palliativa (Dobson & Scase 2007; Garrett 2014; London & Thamm 2020; Oliveira et al. 2020; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022b). Quando utilizzata come singola terapia, consiste nella somministrazione di un certo numero di frazioni di radiazioni, ad intervalli regolari, in diverse sedute, fino a quando il tumore non è più rilevabile. Quando adiuvante viene associata alla chirurgia per ridurre il rischio di recidiva del tumore. Inoltre, può essere palliativa, protocollo utilizzato per ridurre il dolore e il disagio associati ai mastocitomi inoperabili o metastatici (Oliveira et al. 2020; De Nardi et al. 2022).

La radioterapia può anche essere effettuata direttamente sul linfonodo. Essa migliora il controllo loco-regionale e la sopravvivenza nei mastocitomi di alto grado; nonostante questo può aumentare i costi e prolungare il trattamento. Inoltre, necessita di metodiche di ricerca del linfonodo sentinella per definire quale linfonodo aggredire con la terapia. È necessario evidenziare che, non eseguendo la linfadenectomia, il grado di metastasi linfonodale è sconosciuto (Mendez et al. 2020; Guerra et al. 2022).

La combinazione di chirurgia e radioterapia sembra essere molto efficace nel prevenire la recidiva, con il 94-97% dei casi che raggiungono tassi di sopravvivenza senza malattia a 12 mesi (Dobson & Scase 2007; Marconato et al. 2022b). La combinazione di terapia farmacologica e radioterapia porta ad una riduzione significativa del tumore e al miglioramento della prognosi. In particolare, il 70% dei cani ha avuto una risposta completa al trattamento, il 20% ha avuto una risposta parziale e il 10% non ha risposto al trattamento (Dobson *et al.* 2004).

La risposta del tumore alle radiazioni è considerata dose-dipendente; pertanto, l'aumento della dose può portare a un significativo aumento della risposta del tumore. È necessario però valutare le possibili reazioni avverse locali (Dobson et al. 2004; De Nardi et al. 2022).

3.9.3 Terapia di supporto

La terapia di supporto viene proposta quando i soggetti manifestano sintomi sistemici o locali. Si può associare a chemioterapia neoadiuvante o preoperatoriamente per prevenire la sintomatologia da degranulazione indotta dalla manipolazione del chirurgo. I farmaci utilizzati sono inibitori dei recettori istaminici H1 e H2, sucralfato e inibitori di pompa protonica quando presente sintomatologia gastroenterica, analgesici e antiinfiammatori (De Nardi et al. 2022).

3.9.4 Elettrochemioterapia

L'elettrochemioterapia è una terapia locale che combina l'applicazione di farmaci chemioterapici specifici con l'applicazione di impulsi elettrici che inducono la permeabilizzazione temporanea della membrana cellulare, consentendo ai farmaci chemioterapici di penetrare nelle cellule tumorali e ucciderle. Può essere utilizzata come terapia unica o in combinazione con la chirurgia (Spugnini et al. 2011; Blackwood et al. 2012; Bassoe et al. 2017; Oliveira et al. 2020; De Nardi et al. 2022). L'elettrochemioterapia agisce direttamente sulle cellule tumorali causandone la morte (effetto citotossico). Ha effetti indiretti, con vasocostrizione in sede tumorale, riducendo l'apporto ossigeno e nutrienti alle cellule tumorali rendendole più vulnerabili all'azione dei chemioterapici. Inoltre, stimola una risposta immunitaria locale attraverso l'apoptosi delle cellule tumorali (Spugnini et al. 2011; Bassoe et al. 2017; De Nardi et al. 2022).

In genere, l'elettrochemioterapia è consigliata per i tumori di dimensioni inferiori a 3 cm, dove anche una singola sessione può portare a una completa risposta a lungo termine. È particolarmente utile per i mastocitomi situati in posizioni difficili da operare e per i tumori con margini compromessi (Spugnini *et al.* 2011; De Nardi *et al.* 2022).

Bassoe et al. riporta l'efficacia del trattamento di mastocitomi cutanei canini, riportando una risposta completa nel 93% dei cani come adiuvante alla chirurgia, mentre come terapia singola si dimostra una risposta completa nell'80% dei casi (Bassoe *et al.* 2017). In un altro studio, tale tecnica ha prodotto una risposta completa nel 78% di mastocitomi con margini chirurgici compromessi o di grado II-III (Spugnini *et al.* 2011).

Tuttavia, è importante considerare che l'elettrochemioterapia richiede attrezzature specialistiche e può comportare costi significativi. Inoltre, esistono pochi studi sull'efficacia di questa tecnica e gli studi effettuati riportano una ridotta casistica. Pertanto, risulta difficile capire la reale efficacia di questa tecnica nel trattamento dei MCT (Mir et al. 2006; Spugnini et al. 2011; Bassoe et al. 2017; De Nardi et al. 2022).

3.10 PROGnosi E OUTCOME

L'outcome clinico non è correlato a razza, sesso, età, localizzazione tumorale, dimensioni o presentazione clinica della neof ormazione. Si dimostra invece correlato allo stadio clinico WHO, alla recidiva, al grado istologico, al pattern delle cellule neoplastiche, all'infiltrazione dei margini di escissione, all'indice Ki67 e al KIT pattern (Sledge et al. 2016; Horta et al. 2018; De Nardi et al. 2022).

Soggetti classificati in stadio clinico III e IV presentano prognosi peggiore. Viceversa, soggetti in stadio I, senza recidive, con margini di escissione puliti e presentanti un mastocitoma di grado I-II, con bassi indici proliferativi e senza mutazioni KIT, presentano un migliore prognosi (Sledge et al. 2016; Horta et al. 2018; London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022).

La chemioterapia migliora la prognosi in cani con stadio III, con recidiva o presentanti fattori prognostici negativi (Sledge et al. 2016; London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022).

Il tempo libero dalla malattia e sopravvivenza non sembrano correlati ad una completa o incompleta escissione chirurgica. Tuttavia, i margini chirurgici incompleti possono aumentare il rischio di recidiva, e di conseguenza peggiorare la prognosi. In uno studio, il 40,7% dei cani con margini incompleti e il 16% dei cani con margini completi ha sviluppato una recidiva del tumore o è deceduto per cause legate al mastocitoma (De Nardi *et al.* 2022). In un altro studio, si riportano tassi di recidiva dell'8-23% nei mastocitomi escissi a margini incompleti rispetto al 7-9% di recidiva quando asportati a margini completi (Gill *et al.* 2020; Guerra *et al.* 2022).

La sopravvivenza è correlata al grado di differenziazione dei mastocitomi, con tempi più lunghi per tumori altamente differenziati e tempi più brevi per quelle scarsamente o non differenziati. Kiupel et al. riportano una sopravvivenza nel grado I maggiore di 2 e 16 volte rispettivamente ai gradi II e III, mentre la sopravvivenza nel grado II è cinque volte maggiore rispetto al grado III (Patnaik et al., 1984). Altri studi hanno evidenziato tassi di sopravvivenza elevati a 2 anni per mastocitomi di grado I (91-100%) e grado II (71-89%), mentre abbiamo percentuali ridotte in mastocitomi di grado III (36-42%) (Simoès et al., 1994; Murphy et al., 2006; London & Thamm, 2020). Sono state riportate percentuali di sopravvivenza a lungo termine dopo l'asportazione chirurgica per i mastocitomi ben differenziati (80-90%) e mediamente differenziati (75%) (London & Thamm, 2020).

L'assenza di mutazioni del gene c-KIT è associata ad una sopravvivenza prolungata, mentre le mutazioni dell'esone 11 sono associate ad un aumento di mortalità correlata al mastocitoma (69%) (Horta et al., 2018).

È stato osservato che c'è una correlazione tra il grado tumorale e la mortalità. Uno studio ha evidenziato che i mastocitomi di grado III hanno 20,5 volte il rischio maggiore rispetto ai grado II di morte, che a loro volta hanno 20,5 volte il rischio rispetto ai grado I (Patnaik *et al.* 1984). A sostegno di questa affermazione, altri studi hanno riportato tassi di mortalità correlati al tumore del 7% nei grado I, 12-56% nei grado II e 94% nei grado III (Patnaik et al. 1984; Kiupel et al. 2011; Sabattini et al. 2022). Anche secondo la classificazione Kiupel, mastocitomi di basso grado riportano tassi di mortalità inferiori (16%) rispetto a quelli di alto grado (61%) (Horta *et al.* 2018). Gli stadi clinici I e II presentano il 14% di morti correlate al mastocitoma, mentre gli stadi III e IV hanno un tasso del 62% (Horta et al. 2018; De Nardi et al. 2022).

4 PARTE SPECIALE

Il mastocitoma (MCT) è un tumore con comportamento biologico molto variabile. Tra i diversi fattori prognostici descritti, le metastasi linfonodali rappresentano un'alterazione di particolare valore. Risulta quindi fondamentale la loro corretta individuazione, tenendo conto che il linfonodo sentinella nel 22-80% dei casi risulta diverso dal linfonodo regionale (Warland et al., 2014; Worley, 2014; Ferrari et al., 2018; Rossi et al., 2018; Grimes et al., 2020; Ferrari et al., 2020; Randall et al., 2020; Ferrari, Boracchi, et al., 2021; Ferrari, Zani, et al., 2021; Lapsley et al., 2021; Marconato & Foglia, 2021; Willmann et al., 2021; Marconato et al., 2022a; De Bonis et al., 2022; Rinaldi et al., 2022; Alvarez-Sanchez et al., 2023).

L'obiettivo principale di questo studio è stato valutare la percentuale di linfonodi sentinella individuati tramite linfoangiografia indiretta preoperatoria con tomografia computerizzata (ICTL) e blu di metilene (MB) intraoperatorio. Il secondo obiettivo è stato identificare la concordanza tra linfonodo sentinella (SLN) e regionale (RLN) identificati rispettivamente con ICTL e MB. Si ipotizza che nel 50% dei casi i linfonodi sentinella e regionali differiscano completamente tra loro, e che le tecniche di mapping preoperatoria e intraoperatoria siano sovrapponibili nella loro identificazione.

4.1 MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi cani con diagnosi citologica di mastocitoma sottoposti sia a ICTL sia a MB intraoperatorio presso il servizio di Chirurgia e Oncologia dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) dell'Università di Parma, dal 1 giugno 2022 al 30 giugno 2023. Sono stati inclusi cani con MCT singoli in prima presentazione o recidivanti e multipli. Per ciascun animale sono stati raccolti dati anamnestici e clinici secondo la cartella clinica presente nel sistema di archiviazione dell'OVUD e mediante un documento nominato "scheda visita" redatto tramite l'utilizzo di Microsoft® Word (Versione 2308 Build 16.0.16731.20052).

Le informazioni a carattere generale comprendevano: data della prima visita, nome e cognome del proprietario, nome dell'animale, età, sesso (considerando quattro categorie ovvero femmina intera, femmina sterilizzata, maschio intero, maschio castrato) e razza dell'animale. Solo in caso di presentazione come recidiva locale o di consulto post-chirurgico per la rimozione di un precedente mastocitoma asportato a margini incompleti, si richiedeva: data dell'intervento precedente, numero di neoformazioni rimosse, regione anatomica d'intervento, dimensioni di tutte le neoformazioni, se era stata o meno effettuata linfoadenectomia e di quali linfonodi, e se fossero state eseguite indagini diagnostiche citologiche o istologiche sulla neoformazione rimossa e/o sui linfonodi.

Altre informazioni raccolte erano: giorno in cui il proprietario ha notato la neoformazione, presenza o meno di prurito o dolore, cambiamenti di forma e rapidità di crescita della neoformazione. È stato quindi eseguito un esame obiettivo generale e speciale della neoformazione, riportando: numero di neoformazioni presenti, loro dimensione (misurate mediante calibro) e regione anatomica di appartenenza. Per facilitare l'identificazione di quest'ultimo dato, sono state scattate delle fotografie. Inoltre, è stato riportato se la neoformazione fosse ulcerata o meno, se presente linfoadenomegalia e di quali linfonodi ed identificato il/i linfonodo/i regionali secondo lo schema di Suami (Suami *et al.* 2013). La valutazione preliminare includeva inoltre esame emocromocitometrico, biochimica sierica completa e parametri coagulativi. Veniva poi programmato l'esame linfangiografico.

4.1.1 Linfangiografia indiretta

La raccolta dati dell'esame linfangiografico indiretto è stata coadiuvata dalla compilazione di un documento nominato "scheda linfangio-TC" redatto tramite l'utilizzo di Microsoft® Word (Versione 2308 Build 16.0.16731.20052).

I dati raccolti comprendevano: nome dell'animale e giorno di esecuzione dell'esame linfangiografico, decubito, tipo di contrasto utilizzato, quantità di contrasto inoculato, se effettuata o meno scansione con contrasto endovenoso, la comparsa di reazioni avverse al mezzo di contrasto utilizzato e se è stato effettuato il massaggio della regione d'inoculazione tra le scansioni a T5 e T10. La parte specifica sull'esame tomografico comprendeva cinque scansioni identificate con il tempo di scansione relativo (T0, T2, T5, T10, T15, dove il numero indica i minuti intercorsi tra l'inoculazione perilesionale del mezzo di contrasto e la scansione TC), con presa o meno di contrasto (sì/no) e con compilazione libera per inserire i nomi dei dotti e/o linfonodi eventualmente coinvolti.

Tutte le linfangiografie sono state eseguite con lo stesso tipo di mezzo di contrasto, la stessa quantità e tempistiche di scansione.

Le procedure diagnostiche venivano eseguite in anestesia generale, con un protocollo differente in base alla valutazione preanestesiologica dei pazienti. L'esame tomografico dell'animale è stato effettuato tramite tomografia computerizzata Siemens Somatom Sensation Open 20 Slice. Tutte le scansioni sono state eseguite a 140 KVp e 150 mAs, con spessore delle fette di 4 mm. Sono state eseguite due scansioni senza contrasto, una prima total body in posizione sternale, e una seconda scansione in apnea. Solo nei pazienti in cui fosse necessario per la pianificazione della chirurgia è stata eseguita la scansione con contrasto endovenoso (IOMERON® 300 mg/ml soluzione iniettabile, Iomeprolo 61,24 g/100ml). Successivamente il paziente è stato posizionato in modo da permettere il migliore drenaggio linfatico della neoformazione, evitando ostruzioni delle vie linfatiche conferenti la regione tumorale. Per la linfangiografia è stato inoculato peritumoralmente 1 ml totale (0,25 in 4 punti) di IOMERON® 300 mg/ml (Iomeprolo 61,24 g/100ml), scaldato a 37°C. La prima scansione eseguita corrispondeva con la fine dell'iniezione, identificata come T0; sono poi state eseguite scansioni seriali in tempi definiti, ovvero a 2, 5, 10 e 15 minuti dalla fine dell'iniezione. In caso di mancata presa di contrasto di linfonodi a T5, veniva eseguito un massaggio peritumorale, avendo cura di non manipolare direttamente il mastocitoma, al fine di favorire il drenaggio linfatico. A fine scansione sono stati identificati i dotti linfatici e/o il/i linfonodo/i che ha/hanno preso contrasto (corrispondenti al/ai linfonodo/i sentinella), è stato valutato il pattern

(omogeneo o eterogeneo) e identificate le Unità di Hounsfield (HU) dei linfonodi a T15 (Figura 6, 7). Successivamente si è proceduto alla pianificazione chirurgica.

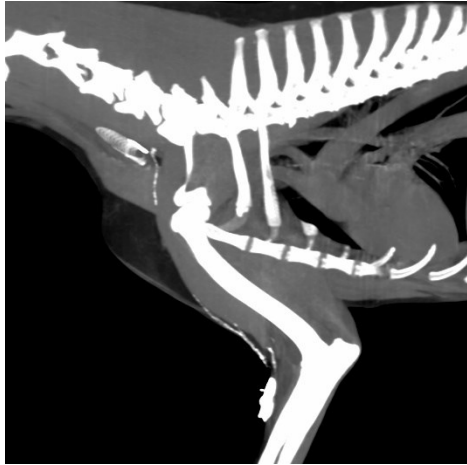


Figura 6 – Scansione TC a T0 con presa di contrasto di dotto e linfonodo cervicale ventrale superficiale di mastocitoma cutaneo su avambraccio sinistro.

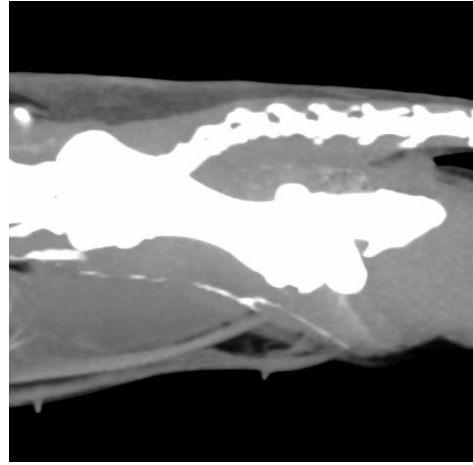


Figura 7 – Scansione TC a T10 con presa di contrasto di dotto e linfonodo inguinale sinistro, di mastocitoma cutaneo falangi posteriori sinistro.

La concordanza tra SLN e RLN era considerata assente quando la presa di contrasto avveniva da parte di un linfonodo non considerato regionale, parziale quando uno dei linfonodi sentinella identificati corrispondeva al regionale, completa quando il linfonodo sentinella corrispondeva esattamente al linfonodo regionale.

In caso di presenza di fattori prognostici clinici negativi, veniva eseguito l'esame citologico di fegato e milza ecoaguidati.

4.1.2 Chirurgia

L'inoculazione peritumorale di 1 ml (0.25 ml in 4 quadranti) blu di metilene veniva eseguita dopo la tricotomia ma prima dello scrub chirurgico, circa 15 minuti prima dell'inizio della chirurgia. Quando possibile la linfoadenectomia veniva eseguita prima dell'exeresi del tumore.

Per ciascuna chirurgia i dati raccolti erano: giorno della chirurgia, inoculazione di blu di metilene (no/sì e quanti ml), decubito (dorsale/ventrale/laterale destro/laterale sinistro), linfoadenectomia (quali linfonodi, regionale/sentinella), presa di contrasto con blu di metilene (no/sì, dotto o linfonodo e quali).

Il margine chirurgico applicato prevedeva la rimozione secondo il sistema proporzionale, nel caso di mastocitomi citologicamente di basso grado di diametro inferiore a 2 cm più un piano fasciale sottostante; in tutti gli altri cani i MCT venivano asportati con 3 cm di margine laterale e un piano fasciale profondo. Una volta rimosso il tumore primario, il margine profondo veniva inchiostroato,

mentre quelli laterali venivano identificati tramite applicazione di punti di sutura, utilizzati anche per ridurre lo shrinkage. Tutti i linfonodi e le neoformazioni rimosse venivano conservate in formalina tamponata al 10% e spedite al laboratorio di riferimento entro 24-48h dalla rimozione per l'esame istologico. Tutti i referti istologici riportavano il grado del mastocitoma cutaneo secondo la classificazione di Patnaik e Kiupel e la classificazione di Weishaar per i linfonodi. La valutazione dei linfonodi è stata eseguita tramite colorazione di blu di toluidina, nei casi in cui non erano apertamente metastatici. Nei casi di tumori di grado elevato veniva richiesta la valutazione del Ki67, calcolato secondo il metodo proposto da Vascellari et al. (Vascellari et al., 2013). In base all'esito dell'esame istologico, veniva poi impostato o meno un protocollo chemioterapico adiuvante.

4.1.3 Analisi dati

Tutti i dati sono stati raccolti in una tabella creata con Microsoft® Excel® (Versione 2308 Build 16.0.16731.20052).

La statistica descrittiva è stata utilizzata per valutare le caratteristiche dei tumori e la concordanza tra le due tecniche di mappatura. Le variabili continue sono state espresse come mediana e intervallo in caso di distribuzione non normale, e come media in caso di distribuzione normale. Le frequenze sono riportate per le variabili categoriche.

4.2 RISULTATI

Mastocitomi

In questo studio sono stati inclusi 20 cani, dei quali 2 soggetti hanno sviluppato due mastocitomi *de novo* dopo 10 e 13 mesi dalla prima chirurgia. Sono state eseguite 27 linfangiografie-TC e MB intraoperatorio, coinvolgenti 26 neoformazioni e una revisione di ferita chirurgica.

Le razze incluse erano meticcica (n=5), labrador retriever (n=3), boxer (n=2), jack russel terrier (n=2), golden retriever (n = 1), bulldog francese (n=1), border collie (n=1), bracco italiano (n=1), segugio dei Balcani (n=1), setter gordon (n=1), siberian husky (n=1), yorkshire terrier (n=1) (Tabella 13).

Dei 20 soggetti inclusi nello studio, 7 (35%) erano maschi (dei quali 5 interi e 2 castrati) e 13 (65%) erano femmine (8 intere e 5 sterilizzate). L'età media alla diagnosi era 8,7 anni (6-12), la mediana era 8,5 anni. Il peso medio e mediano erano rispettivamente 22,2 Kg e 23,8 Kg (6,3-37,6Kg). Di 22 casi, 4 (18,2%) presentavano mastocitomi multipli (3 casi con 2 neoformazioni, 1 caso con 3

neoformazioni), mentre l'81,8% aveva mastocitomi in forma singola. Era presente linfadenomegalia in 6/22 casi (27,3%).

Di 27 neoformazioni, 5 (18,5%) non erano misurabili perché regredite o cicatrice da precedente exeresi di mastocitoma. La media e la mediana delle dimensioni delle restanti 22 neoformazioni al momento della visita erano rispettivamente 2,1 cm e 2 cm di diametro maggiore (0,5-6 cm). Le neoformazioni o la cicatrice erano pruriginose in 3/27 (11,1%) casi, ulcerate in 3/27 (11,1%) casi e dolenti in 1/27 (3,7%) casi. Le sedi

di localizzazione tumorale erano coscia (n=3), ginocchio (n=2), vulva/regione perivulvare (n=2), addome caudale (n=2), falangi (n=2), regione poplitea (n=2), scroto (n=2, compresa la cicatrice conseguente all'escissione da parte di altri colleghi), collo (n=1), torace (n=1), ascella (n=1), avambraccio (n=1), grassella (n=1), addome craniale (n=1), fianco (n=1), regione perianale (n=1), prescapolare (n=1), sterno (n=1), testa (n=1), mandibolare (n=1) (Tabella 14).

Razza	nr	%
Meticcio	5	25
Labrador Retriever	3	15
Boxer	2	10
Jack Russel Terrier	2	10
Golden Retriever	1	5
Bulldog Francese	1	5
Border Collie	1	5
Bracco Italiano	1	5
Segugio dei Balcani	1	5
Setter Gordon	1	5
Siberian Husky	1	5
Yorkshire Terrier	1	5

Tabella 13 - Numero soggetti per razza e percentuali

Localizzazione	nr	%
coscia	3	11,2
ginocchio	2	7,4
vulvare/perivulvare	2	7,4
addome caudale	2	7,4
falangi	2	7,4
poplitea	2	7,4
scroto	2	7,4
collo	1	3,7
torace	1	3,7
ascellare	1	3,7
avambraccio	1	3,7
grassella	1	3,7
addome craniale	1	3,7
fianco	1	3,7
perianale	1	3,7
prescapolare	1	3,7
sterno	1	3,7
testa	1	3,7
mandibolare	1	3,7

Tabella 14 – Numero di mastocitomi per localizzazione e percentuale.

Istologia

In totale sono stati inclusi 27 mastocitomi, di cui 1 era una cicatrice con malattia residua da precedente chirurgia con escissione incompleta. Tutti i mastocitomi e i linfonodi rimossi (n=41) sono stati

Istologia	low	high	sc
I	2	0	
II	19	2	
III	0	1	
sc			3

Tabella 15 – Analisi istologica dei mastocitomi

analizzati istologicamente. Di questi 27 MCT, 3 erano sottocutanei (11,1%), i restanti 24/27 (88,9%) cutanei. Di questi ultimi, secondo la classificazione di Patnaik, 2/24 (8,3%) erano di grado I, 21/24 (87,5%) di grado II e 1/24 (4,2%) di grado III. Secondo la classificazione di Kiupel, 21/24 (87,5%) erano di basso grado e 3/24 (12,5%) di alto grado. Utilizzando entrambe le classificazioni, 2/24

mastocitomi (8,3%) erano di grado basso/I (1P/LK), 19/24 (79,2%) erano basso/II (2P/LK), 2/24 (8,3%) erano alto/II (2P/HK) e 1/24 (4,2%) era alto/III (3P/HK) (Tabella 15).

Mapping del linfonodo

Sono state eseguite un totale di 27 ICTL (tabella 19). In 3/27 (11,1%) non è stato evidenziato alcun linfonodo e nessun vaso linfatico drenante. 24/27 (88,9%) ICTL hanno evidenziato almeno un SLN o dotto relativo. Di queste, 6/24 (25%) hanno evidenziato un singolo linfonodo sentinella, il restante 75% (18/24) ha evidenziato SLN multipli.

Sono stati identificati 36 SLN mediante ICTL. Di questi, 6/36 (16,7%) hanno preso contrasto a T0, 5/36 (13,9%) a T2, 2/36 (5,6%) a T5, 20/36 (55,5%) a T10, 3/36 (8,3%) a T15.

La corrispondenza tra linfonodo sentinella e regionale è stata identificata in modo completo in 4 di 24 linfangiografie ovvero nel 16,7% dei casi, in modo parziale in 14/24 ICTL ovvero nel 58,3% dei casi, assente in 6/24 ovvero nel 25% dei casi.

Entrambe le linfangiografie eseguite su mastocitomi nella regione del ginocchio non hanno avuto successo. Non sono state riscontrate differenze di corrispondenza tra RLN e SLN in base alla localizzazione tumorale.

Non sono state riscontrate positività citologiche per metastasi a fegato e milza.

Linfangiografia con colorante vitale

La linfangiografia con colorante vitale è stata eseguita su tutti i 27 mastocitomi asportati. Nel 29,6% (8/27) dei casi l'uso del blu di metilene non ha evidenziato nessun drenaggio linfatico, mentre nel 62,9% (17/27) sono stati evidenziati i SLN precedentemente identificati con ICTL. In un caso su 27 il blu di metilene ha evidenziato un linfonodo regionale quando la ICTL non ha avuto successo. In 1 caso su 27 (3,7%) vi è stata una corrispondenza parziale tra MB e ICTL, ovvero ha colorato solo parte dei SLN rimossi (Tabella 19).

Sono stati rimossi 41 linfonodi totali, dei quali 27 SLN (65,8%). Nove di 36 SLN (33,3%) non sono stati rimossi perché erano linfonodi intracavitari o che comunque avrebbero reso l'intervento molto più invasivo per l'animale oppure non erano la prima stazione linfatica drenante.

Dei 41 linfonodi rimossi, 25 hanno drenato blu di metilene. Di questi, 23/25 (92%) erano SLN identificati preoperatoriamente con ICTL, mentre 2/25 (8%) erano linfonodi regionali non identificati precedentemente in ICTL.

In un solo caso su 27 totali è riuscita la linfangiografia intraoperatoria MB quando la ICTL non ha avuto successo.

Istologia dei linfonodi

Sono stati rimossi 41 linfonodi totali, tutti analizzati istologicamente. 29 di 41 (70,7%) erano SLN, 7/41 (17,1%) erano linfonodi di dotti captanti mezzo di contrasto con ICTL quindi considerati linfonodi sentinella, 5/41 (12,2%) RLN.

Sono stati rimossi mediamente 1,9 linfonodi per soggetto (41 linfonodi in 22 chirurgie).

Di questi 41, 17 (41,5%) erano HN0, 12 (29,3%) erano HN1, 9 (22%) erano HN2 e 3 (7,3%) erano HN3. Di 17 linfonodi HN0 asportati, il 76,5% (13/17) è stato asportato da soggetti con mastocitomi di grado basso/II (2P/LK), uno su 17 linfonodi (5,9%) da un soggetto con mastocitoma di grado alto/III (3P/HK) e 3 di 17 linfonodi HN0 (17,6%) erano associati a mastocitomi sottocutanei. Dieci dei 12 linfonodi HN1 (83,3%) sono stati asportati da soggetti con mastocitoma di grado basso/II (2P/LK) e 2 di 12 (16,7%) di grado alto/II (2P/HK). Di 9 linfonodi HN2 asportati, 2 (22,2%) sono stati asportati da soggetti con mastocitoma di grado basso/I (1P/LK) e 4 (44,4%) da MCT di grado basso/II (2P/LK). Dei 3 linfonodi HN2 rimanenti, 2 sono stati asportati da soggetti con MCT di grado alto/II (2P/HK) e in un solo caso (11,1%) erano associati a mastocitoma sottocutaneo. I linfonodi HN3 sono 3, correlati a basso/II (tabella 16).

Lnf totali	low/I	Low/II	High/II	high/III	sc
HN0	0	13	0	1	3
HN1	0	10	2	0	0
HN2	2	4	2	0	1
HN3	0	3	0	0	0

Tabella 16 – Analisi istologica dei linfonodi rimossi, rapportati col grado istologico della neoformazione primaria

Dei 41 linfonodi rimossi, 4 (9,8%) non erano esplorabili alla visita clinica, 32/41 (78%) non risultavano megalici e 5/41 (12,2%) erano megalici. Dei 5 megalici, 2/5 (40%) erano HN0, 2/5 (40%) erano HN2 e un solo linfonodo (20%) era HN3. Dei 32 non megalici, 11/32 (34,4%) erano HN0, 12/32 (37,5%) erano HN1, 7/32 (21,8%) erano HN2 e 2/32 (6,3%) erano HN3 (tabella 17).

Lnf rimossi	HN0	HN1	HN2	HN3
non megalici	11	12	7	2
megalici	2	0	2	1
non esplorabili	4	0	0	0

Tabella 17 – Numero di linfonodi megalici sul totale dei linfonodi rimossi, rapportati al grado istologico.

Dei 36 linfonodi sentinella rimossi, 7 erano linfonodi relativi ai dotti linfatici. Di questi ultimi 7, 1/7 (14,3%) era HN0, 1/7 (14,3%) erano HN1, 2/7 (28,6%) erano HN2 e 3/7 (42,8%) erano HN3. I restanti 29 SLN erano 14/29 (48,3%) HN0, 10/29 (34,5%) erano HN1, 5/29 (17,2%) erano HN2 e nessuno era HN0 (Tabella 18).

Dei 36 SLN, sono stati identificati 15 Inf HN0, dei quali 11 erano relativi a MCT low/II, 1 di high/II e 3 di MCT sottocutaneo. Dei 11/36 HN1, 10 erano relativi a mct low/II e 1 a high/II. Dei 7/36 HN2, 4 erano relativi a low/II, 2 erano high/II, 1 era relativo a mct sottocutaneo. Dei 3 SLN HN3, tutti erano relativi a mct low/II.

Sentinella	low/I	low/II	high/II	high/III	sc
HN0	0	11	0	1	3
HN1	0	10	1	0	0
HN2	0	4	2	0	1
HN3	0	3	0	0	0

Tabella 18 – Grado istologico dei linfonodi sentinella, rapportati col grado istologico della neoformazione primaria.

Chemioterapia

Su 22 cani, uno (4,5%) ha fatto terapia neoadiuvante prima dell'intervento chirurgico poiché ha sviluppato noduli satelliti alla neoformazione primaria. La chemioterapia adiuvante è stata eseguita in 5/22 (22,7%) cani, di cui 2 perché i linfonodi erano metastatici (HN3), 2 perché il mastocitoma era di alto grado secondo Kiupel, uno perché di alto grado secondo Kiupel e Patnaik.

Tabella 19 – raccolta dati dello studio. N.i = non identificato; ICTL = linfangiografia indiretta tomografica computerizzata; MB = utilizzo di bi di metilene intraoperatorio.

cane	ICTL/MB	neof	RLN	SLN/D	TEMPI	RIMOSSI	ISTO LNF	BLU	ISTO MCT	
1	1	coscia sx	inguinale superficiale sx	inguinale superficiale sx	T10	inguinale superficiale sx	HN1	si		
				popliteo dx (dotto)	T0 (dotto)	popliteo dx (dotto)	HN2	si	2P-LK	
2	2	regione poplitea sx	inguinale superficiale sx	inguinale caudale sx	T2	inguinale caudale sx	HN2	si		
				inguinale craniale sx	T10				Sc	
				iliaco mediale sx	T15					
				popliteo dx	T10	popliteo dx	HN0	si		2P-LK
				iliaco dx	T10	iliaco dx	HN0	si		2P-LK
4	4	avambraccio sx	prescapolare dx	prescapolare dx	T0	iliaco dx	HN1	si	2P-LK	
			inguinale superficiale sx	inguinale superficiale sx	T10	inguinale superficiale sx	HN2	si	2P-LK	
5	5	grassella sx		iliaco sx	T 10				2P-LK	
				ascellare sx	T2	ascellare sx	HN1	no	2P-LK	
6*	7*	scroto	inguinale superficiale sx	mediastinico-retrosternale	T5					
			inguinale superficiale dx	inguinale superficiale dx	T10	inguinale superficiale dx	HN0	no	2P-LK	
7	8	perivulvare sx	inguinale sx	sacro-iliaci	T0	inguinale sx	HN3	no	2P-LK	
				inguinale sx (dotto)	T0	inguinale dx	HN2	no	2P-LK	
8	9	regione poplitea dx	popliteo dx	n.i.	n.i	popliteo dx	HN1	no	2P-LK	
			inguinale superficiale dx	inguinale superficiale dx (dotto)	T0 (dotto)	inguinale superficiale dx	HN3	si	2P-LK	
9	10	ginocchio dx	popliteo dx	inguinale superficiale sx (dotto)	T0 (dotto)	inguinale superficiale sx	HN3	no	2P-LK	
			inguinale superficiale dx	n.i.	n.i	popliteo dx	HN0	no	1P-LK	
10	11	ginocchio dx	inguinale superficiale dx	inguinale superficiale dx	n.i	inguinale superficiale dx	HN2	no		
			popliteo dx	prescapolare sx	T10	popliteo dx	HN2	no	3P-HK	
11	12	prescapolare sx	inguinale superficiale dx	ascellare sx	T15					
			popliteo dx	prescapolare sx	T10	prescapolare sx	HN1	si	1P-LK	
12	14	falangi ant sx	inguinale superficiale sx	prescapolare sx	T0	prescapolare sx	HN1	si	2P-LK	
			prescapolare sx	prescapolare sx	T0	prescapolare sx	HN1	si	2P-LK	

13	15	coscia dx	inguinale superficiale sx	inguinale superficiale dx	T0	inguinale superficiale dx	inguinale superficiale dx	HN2	si	2P-LK
14	16	vulva	inguinale superficiale sx	inguinale profondo dx ascellare	T2	ascellare	ascellare	HN2	si	2P-HK
15	17	regione occipitale dx	cervicale dorsale dx	ascellare accessorio prescapolare dx	T10	ascellare accessorio prescapolare dx	ascellare accessorio prescapolare dx	HN1	si	2P-HK
16	18	addome caudale sx	inguinale superficiale sx	retrofaringeo dx (dotto)	T0 (dotto)	retrofaringeo dx (dotto)	retrofaringeo dx	HN1	si	2P-LK
17	19	scroto	inguinale superficiale dx	inguinale superficiale sx	T10	inguinale superficiale sx	inguinale superficiale sx	HN1	si	2P-LK
18	20	perineale sx	inguinale superficiale sx e dx	inguinale profondo sx	T10	inguinale profondo sx	inguinale superficiale sx	HN1	si	2P-LK
19	21	coscia sx	inguinale superficiale sx	iliaco sx	T10	iliaco sx	iliaco sx	HNO	no	2P-LK
20	22	addome craniale sx (med)	sacrale sx e dx	sacrale sx	T10	sacrale sx	sacrale sx	HNO	no	2P-LK
21	23	torace dx	inguinale superficiale sx	popliteo sx	T10	popliteo sx	sacrale dx	HNO	no	2P-LK
22	24	fianco dx	ascellare sx	gluteo sx	T15	gluteo sx	popliteo sx	HN1	si	2P-LK
23	25	collo sx	ascellare dx	ascellare dx	T10	ascellare dx	gluteo sx	HNO	si	2P-LK
24	26	mandibolare dx	inguinale dx	ascellare dx	T10	ascellare dx	ascellare dx	HNO	si	2P-LK
25	27	ascellare sx	cervicale dorsale sx	ascellare accessorio dx	T5	ascellare accessorio dx	ascellare accessorio dx	HNO	si	SC
26	28		sottomandibolare dx	n.i.	n.i	n.i.	inguinale dx	HNO	si	SC
27	29		sottomandibolare dx	cervicale dorsale sx	T2	cervicale dorsale sx	inguinale dx	HNO	no	2P-LK
28	30		sottomandibolare dx	sottomandibolare sx	T0	sottomandibolare sx	sottomandibolare sx	HNO	no	2P-LK
29	31		sottomandibolare dx	sottomandibolare dx	T0	sottomandibolare dx	sottomandibolare dx	HN1	no	2P-LK
30	32		ascellare sx	retrofaringeo dx	T0	retrofaringeo dx	retrofaringeo dx	HNO	no	2P-LK
31	33		ascellare sx	ascellare dx	T10	ascellare dx	ascellare dx	HNO	si	SC
32	34		ascellare sx	ascellare accessorio dx (dotto)	T0 (dotto)	ascellare accessorio dx (dotto)	ascellare accessorio dx	HNO	si	SC

5 DISCUSSIONE

L'obiettivo principale di questo studio è stato di valutare la percentuale di linfonodi sentinella individuati tramite linfangiografia indiretta preoperatoria con tomografia computerizzata (ICTL) e blu di metilene (MB) intraoperatorio, la concordanza tra linfonodo sentinella (SLN) e regionale (RLN) mediante ICTL, e valutare la concordanza tra le due metodiche di mapping ICTL e MB nella ricerca del linfonodo sentinella. In base ai risultati ottenuti, la corrispondenza tra RLN e SLN con ICTL è stata completa nel 16,7% dei casi e parziale nel 58,3%. È risulta invece assente nel 25% dei casi, percentuale minore rispetto a quanto ipotizzato. Il MB intraoperatorio identifica nel 66,7% dei casi tutti i linfonodi sentinella identificati in ICTL precedentemente, pertanto non può essere considerata una tecnica del tutto sovrapponibile all'ICTL, ma complementare per l'individuazione del linfocentro.

La razza più frequentemente riscontrata è stata quella meticcias, seguita dal labrador retriever. In letteratura, la razza meticcias è la più comunemente associata allo sviluppo di MCT, il labrador è la seconda razza pura maggiormente colpita. Il boxer è considerato la razza pura di più frequente riscontro, nonostante nel nostro studio fossero presenti solo due soggetti. Questo però potrebbe essere correlato all'area geografica e alla diffusione di tali razze sul territorio (Patnaik et al. 1984; Kosanovich Cahalane et al. 2004; Misdorp 2004; Welle et al. 2008; White et al. 2011; Blackwood et al. 2012; Warland & Dobson 2013; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Śmiech et al. 2017; Śmiech et al. 2018; Śmiech et al. 2019; London & Thamm 2020; Oliveira et al. 2020; Martins et al. 2021; De Nardi et al. 2022; Rinaldi et al. 2022).

La nostra popolazione comprendeva il 35% di soggetti maschi e il 65% di soggetti femmine. Pertanto, il sesso non è stato considerato un fattore predisponente, come nella maggior parte degli studi (Welle et al. 2008; Shoop et al. 2015; Śmiech et al. 2017; Kiupel & Camus 2019; Śmiech et al. 2019; London & Thamm 2020; Martins et al. 2021; De Nardi et al. 2022).

L'età media e mediana era rispettivamente 8,7 e 8,5 anni, confermando ciò che è stato riportato in letteratura (Patnaik et al. 1984; Kosanovich Cahalane et al. 2004; Camus et al. 2016; Blackwood et al. 2012; Śmiech et al. 2018; Śmiech et al. 2019; London & Thamm 2020; Oliveira et al. 2020; Martins et al. 2021; De Nardi et al. 2022; Marconato et al. 2022a).

Le sedi di comparsa più frequenti nel nostro studio erano arti (avambraccio, coscia, falangi, ginocchio, regione poplitea, regione prescapolare) nel 44,5% dei casi, tronco (addome craniale e caudale, ascella, grassella, fianco, sterno, torace) nel 25,9% dei casi, regione perineale (perianale, scroto, vulva e regione perivulvare) nell'18,5%, collo e testa (collo, testa, regione mandibolare) nel 11,1%. Le frequenze da noi rilevate erano simili a quelle riportate in letteratura per arti, tronco, collo e testa, mentre per la regione perianale abbiamo registrato percentuali minori rispetto a quanto riportato in letteratura (36-40%) (Misdorp 2004; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Śmiech et al. 2018; Oliveira et al. 2020; Willmann et al. 2021; Bellamy & Berlato 2022).

Le neoformazioni si presentavano pruriginose in 3/27 (11,1%) casi, ulcerate in 3/27 (11,1%) casi e dolenti in 1/27 (3,7%) casi. La neoformazione dolente si riscontrava a livello delle falangi della zampa anteriore e probabilmente la sollecitazione meccanica era responsabile dell'instaurarsi del prurito. In letteratura è riportata una maggior frequenza di ulcerazione (30%) soprattutto nei mastocitomi indifferenziati, percentuale maggiore rispetto al nostro studio (Welle et al. 2008; MacNeill 2011; Blackwood et al. 2012; Śmiech et al. 2017; Kiupel & Camus 2019; London & Thamm 2020; De Nardi et al. 2022).

I mastocitomi multipli erano il 18,2% dei casi, similmente alle percentuali riportate in vari studi (5-25%), ma non sono risultate predisposizioni di razza nello sviluppo degli stessi, a contrario di ciò che è riferito in bibliografia (Murphy et al. 2006; Welle et al. 2008; Blackwood et al. 2012; Stefanello et al. 2015; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Śmiech et al. 2017, 2019; London & Thamm 2020; Bellamy & Berlato 2022; Marconato et al. 2022).

L'88,9% dei mastocitomi rimossi era cutaneo e l'11,1% era sottocutaneo. Secondo la classificazione di Patnaik, l'8,3% erano di grado I, l'87,5% erano di grado II e il 4,2% erano di grado III. Queste percentuali sono simili alla letteratura, anche se si riscontra in maggior numero mastocitomi di grado 2 rispetto alle frequenze indicate (34-80,5%) e frequenze minori per il grado III (7,6-25,5%) (Patnaik et al. 1984; Preziosi et al. 2004; Murphy et al. 2006; Sabbatini et al. 2015; Hergt et al. 2016; Śmiech et al. 2017; Horta et al. 2018). Secondo la classificazione di Kiupel, l'87,5% erano di basso grado e il 12,5% erano di alto grado, dati pienamente in accordo con le frequenze riportate in letteratura (Camus et al. 2016; Hergt et al. 2016; Scarpa et al. 2016; Śmiech et al. 2017; Horta et al. 2018). Utilizzando entrambe le classificazioni, si riscontra il 79,2% dei mastocitomi definiti 2P/LK,

percentuale maggiore rispetto a quanto affermato in letteratura (53,6-57,6%) (Sabattini et al. 2015; Stefanello et al. 2015; Berlato et al. 2021; Horta et al. 2018; Bellamy & Berlato 2022; Cino et al. 2023). Inoltre, si nota come non vi siano mastocitomi di grado 1P/HK e 3P/LK. Questo conferma la complementarità delle due classificazioni; infatti, come descritto dagli autori, la classificazione di Kiupel dimostra grande utilità nel ridurre l'ambiguità dei mastocitomi di grado II Patnaik, che in questo caso vedrebbe l'87,5% dei mastocitomi, identificando più precisamente mastocitomi con comportamento biologico aggressivo (Kiupel et al. 2011; Sabattini et al. 2015; Scarpa et al. 2016; Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Berlato et al. 2021).

Nel nostro studio la metodica di linfangiografia-TC indiretta ha dato esito positivo nell'identificazione del SLN nel 88,9% dei casi, dove è stato identificato almeno un linfonodo o dotto linfatico. Questo risultato è compatibile con la maggior parte della bibliografia, dove solo uno studio identifica percentuali di riuscita del 60% di questa tecnica (Ferrari et al. 2021b), mentre la maggior parte degli studi riporta percentuali di riuscita tra l'89 e il 96,6% (Grimes et al. 2017; Rossi et al. 2018; Wan et al. 2021), range nel quale collochiamo il nostro studio. La linfangiografia non è stata sempre eseguita dallo stesso operatore, pertanto la riuscita di tale tecnica potrebbe essere operatore-dipendente, anche se in minima parte data la standardizzazione di tale procedura. Anche il posizionamento non adeguato del paziente e l'ostruzione del drenaggio linfatico dovuto sia a compressione meccanica sia a occlusione neoplastica possono aver inciso sulla riuscita di tale tecnica (Grimes et al. 2017; Soultani et al. 2017; Rossi et al. 2018).

Il 75% (18/24) delle ICTL che hanno avuto successo ha rilevato SLN multipli. Questo conferma che il singolo mastocitoma può essere drenato da più linfonodi, in una percentuale maggiore rispetto a quanto affermato in letteratura che riporta il 34% di mastocitomi drenanti a più linfocentri (De Bonis et al. 2022; Guerra et al. 2022).

La maggioranza dei SLN ha captato il mezzo di contrasto a T10. La maggior parte dei SLN che hanno captato contrasto tra T0 e T10 appariva istologicamente come non metastatico o premetastatico (HN0-HN1), mentre nessuno era francamente metastatico (HN3). Istologicamente, i linfonodi cui dotti sono stati rilevati con ICTL sono nel 90,9% HN2-HN3. Questi dati sostengono l'ipotesi che la mancata presa di contrasto possa derivare da ostruzione del drenaggio linfatico da parte delle cellule tumorali o dall'infiltrazione metastatica linfonodale (Grimes et al. 2017; Soultani et al. 2017; Rossi et al. 2018).

I risultati di questo studio rilevano la corrispondenza completa tra SLN e RLN nel 16,7% dei casi, una parziale corrispondenza nel 58,3% dei casi (ovvero che tra i linfonodi sentinella identificati, uno di questi era anche il regionale) e l'assenza di corrispondenza nel 25% dei casi. La percentuale di assenza di corrispondenza è molto variabile in letteratura (22-80%), dipendendo non solo dalla casistica, ma anche dalla tecnica di mapping utilizzata (Warland et al., 2014; Worley, 2014; Ferrari et al., 2018; Rossi et al., 2018; Grimes et al., 2020; Ferrari et al., 2020; Randall et al., 2020; Ferrari, Boracchi, et al., 2021; Ferrari, Zani, et al., 2021; Lapsley et al., 2021; Marconato & Foglia, 2021; Willmann et al., 2021; Marconato et al., 2022a; De Bonis et al., 2022; Rinaldi et al., 2022; Alvarez-Sanchez et al., 2023). L'assenza di corrispondenza tra SLN e RLN risultata nel nostro studio è minore rispetto all'ipotesi iniziale. Tuttavia, i risultati ottenuti confermano l'importanza dell'individuazione dei linfonodi sentinella. Questo perché esiste una reale possibilità di ottenere risultati falsi negativi o di non rilevare la presenza di metastasi linfonodali, con conseguente sottostadiazione della malattia (Blackwood et al., 2012; Worley, 2014; Forte et al., 2016; Hergt et al., 2016; Grimes et al., 2017, 2020; Ferrari et al., 2020; London & Thamm, 2020; Pecceu et al., 2020; Book et al., 2021; Ferrari, Boracchi, et al., 2021; Ferrari et al. 2021b; Ferrari, Zani, et al., 2021; Marconato & Foglia, 2021; Wan et al., 2021; De Bonis et al., 2022; De Nardi et al., 2022; Marconato et al., 2022; Alvarez-Sanchez et al., 2023).

La linfografia intraoperatoria con MB è stata positiva nel 70,4% dei casi, in disaccordo con quanto riportato in bibliografia (84,6-96,6% dei casi) (Worley 2014; Brissot & Edery 2017; Grimes et al. 2020). Nel 29,6% dei casi, invece, non ha avuto successo, non drenando a nessun dotto o linfonodo. Nel 66,7% delle tecniche con MB tutti i linfonodi sentinella rimossi hanno drenato il colorante, nel 3,7% il colorante è stato drenato solo da alcuni dei linfonodi sentinella rimossi dallo stesso linfocentro. Inoltre, questa tecnica ha evidenziato 25/41 linfonodi rimossi, due dei quali non erano stati identificati precedentemente con ICTL. Il nostro studio ha identificato il 61% dei linfonodi sentinella con linfografia intraoperatoria MB, percentuale minore rispetto a quanto riportato in letteratura (77-89%) (Worley 2014; Brissot & Edery 2017; Grimes et al. 2020). Come per la linfoTC, anche l'iniezione peritumorale di colorante non è sempre stata eseguita dallo stesso operatore; inoltre, anche il tempo tra l'inoculazione del colorante e l'effettiva ricerca del linfonodo era differente, e questo può aver influito (anche se in misura minore) sulla riuscita della tecnica. Questi dati smentiscono la nostra ipotesi che la linfangiografia con colorante vitale sia sovrapponibile alla tecnica di mapping preoperatoria per la ricerca del linfonodo sentinella. È però

confermata la complementarità di tali tecniche, dato che la stessa linfangiografia con colorante vitale ha identificato due linfonodi non mappati preoperatoriamente, ma soprattutto ha coadiuvato il chirurgo nella ricerca dei linfonodi sentinella (Ferrari et al. 2017, 2020; Grimes et al. 2020; Ferrari et al. 2021b; Marconato & Foglia 2021; Wan et al. 2021; De Bonis et al. 2022; Guerra et al. 2022; Alvarez-Sanchez et al. 2023).

In totale sono stati rimossi 41 linfonodi, di cui 29 sentinella, 7 linfonodi cui dotti sono stati rilevati mediante ICTL e quindi considerati sentinella, pertanto probabili sentinella, e 5 erano regionali non identificati con nessuna delle due tecniche. Nel nostro studio vi è una maggioranza di linfonodi non megalici, i quali presentano tutti i gradi di metastasi linfonodale. La linfoadenomegalia non è quindi indicatore di metastasi linfonodale, in disaccordo con alcuni studi che la identificano come associata a metastasi (Stefanello D. & Ferrari R. 2016; Pecceu et al. 2020; Marconato & Foglia 2021; Marconato et al. 2022; Ribeiro et al. 2022), ma in accordo con uno studio che riporta il 50% dei linfonodi regionali non megalici ma metastatici all'esame istologico (Ferrari et al. 2018).

La maggior parte dei linfonodi rimossi sono risultati istologicamente non metastatici (HN0, 41,5%), il 29,2% premetastatici (HN1), il 22% precocemente metastatici (HN2) e il 7,3% certamente metastatici (HN3). I mastocitomi di grado 2P/LK avevano tutti i gradi di metastasi linfonodale, confermandolo con comportamento biologico meno definito e più variabile rispetto agli altri gradi di mastocitoma (Bostock, 1973; Murphy et al., 2006; Romansik et al., 2007; Stefanello et al., 2009; Book et al., 2011; O'Connell & Thomson, 2013; Sabattini et al., 2015; Stefanello et al., 2015; Hergt et al., 2016; Scarpa et al., 2016; Horta et al., 2018; Gill et al., 2020; London & Thamm, 2020; Avallone et al., 2021; Berlato et al., 2021; Martins et al., 2021; De Nardi et al., 2022; Ribeiro et al., 2022; Rinaldi et al., 2022).

Nel nostro studio, i tumori di grado 2P/HK avevano linfonodi HN1 e HN2. I due mastocitomi classificati istologicamente di grado 1P/LK erano associati a linfonodi precocemente metastatici (HN2), mentre i tre linfonodi HN3 rimossi erano associati a soggetti con mastocitomi di grado basso/II (2P/LK). Il mastocitoma di grado alto/III (3P/HK) era associato alla rimozione di un unico linfonodo classificato istologicamente come privo di metastasi (HN0). Questi dati suggeriscono che una piccola percentuale di mastocitomi classificati di basso grado secondo la classificazione di Kiupel possono essere associati a metastasi linfonodali, e mastocitomi di alto grado secondo Kiupel possono non essere associati a linfonodi metastatici. Di conseguenza, si conferma l'importanza

della ricerca del linfonodo sentinella per rilevare metastasi linfonodali, anche nei casi in cui il mastocitoma sia di basso grado (Blackwood et al., 2012; Worley, 2014; Forte et al., 2016; Hergt et al., 2016; Grimes et al., 2017, 2020; Ferrari et al., 2020; London & Thamm, 2020; Pecceu et al., 2020; Book et al., 2021; Ferrari, Boracchi, et al., 2021; Ferrari, Zani, et al., 2021; Marconato & Foglia, 2021; Wan et al., 2021; De Bonis et al., 2022; De Nardi et al., 2022; Marconato et al., 2022; Alvarez-Sanchez et al., 2023).

Nessuno dei linfonodi sentinella identificato in ICTL è risultato certamente metastatico (HN3) istologicamente, mentre il 18,5% dei SLN è risultato come precocemente metastatico (HN2). Il nostro studio si dimostra in disaccordo con quanto riportato in letteratura, avendo rilevato una percentuale minore di metastasi linfonodali HN2-HN3 rispetto alla letteratura (32-68%) (Ferrari et al. 2021b, 2021a, 2020; De Bonis et al. 2022; Alvarez-Sanchez et al. 2023). Nel presente studio, i linfonodi istologicamente identificati come HN3 erano linfonodi cui solo i dotti sono stati identificati con ICTL. Questo può ulteriormente supportare l'ipotesi che il grado di ostruzione neoplastica possa influire sull'identificazione di linfonodi sentinella non metastatici rispetto a quelli massicciamente infiltrati.

I limiti delle tecniche sono il malposizionamento dell'animale che può comportare ostruzione meccanica del drenaggio linfatico. Nel nostro studio è stato utilizzato lo stesso protocollo di posizionamento, non valutando questa variabile. Le due tecniche hanno un possibile limite di sensibilità legato all'ostruzione da parte di cellule tumorali del drenaggio linfatico. Inoltre, la percentuale di insuccessi di ICTL comporta la rimozione di un linfonodo senza la certezza che esso sia il metastatico.

Il limite di questo studio è che, per avere la certezza di aver tolto tutti i linfonodi drenanti, era necessario rimuovere tutti i linfonodi regionali, per avere un confronto istologico con i linfonodi sentinella; nel nostro studio, per motivi etici non è stato effettuato.

Inoltre, sono stati valutati solo assenza/presenza di contrasto dei linfonodi in ICTL, invece che rilevazioni tomografiche minori come pattern linfonodale e gradi Hounsfield; nel nostro studio non sono stati considerati poiché in letteratura non sono stati confermati come correlati al grado metastatico linfonodale.

La linfangiografia tomografica computerizzata indiretta è una tecnica affidabile per la ricerca dei linfonodi sentinella nel mastocitoma canino. La corrispondenza tra linfonodo regionale e sentinella

è risultata completa nel 16,7% dei casi in questo studio; ciò vuol dire che le tecniche di mapping sono fondamentali per la corretta identificazione del linfonodo drenante, poiché nella maggior parte dei casi i linfonodi drenanti il tumore non corrispondono al regionale. Le metastasi linfonodali sono un fattore prognostico importante e la loro presenza può indirizzare verso un iter terapeutico differente, adattato al singolo soggetto. L'associazione della linfangiografia preoperatoria con tecniche di mapping intraoperatorie, quale la linfangiografia con colorante vitale valutata in questo studio, può migliorare l'identificazione dei linfonodi sentinella, poiché essa stessa può identificare linfonodi diversi da quelli evidenziati con il mapping preoperatorio, e soprattutto può coadiuvare il chirurgo nella ricerca pratica per la rimozione di tale linfonodo. A contrario di quanto ipotizzato, la linfangiografia con colorante vitale non corrisponde sempre alla linfangiografia-TC nella ricerca del linfonodo sentinella, ma vi è complementare.

6 BIBLIOGRAFIA

- Alvarez-Sanchez A, Townsend KL, Newsom L, Milovancev M, Gorman E, Russell DS. Comparison of indirect computed tomographic lymphography and near-infrared fluorescence sentinel lymph node mapping for integumentary canine mast cell tumors. *Vet Surg*. 2023 Apr;52(3):416-427.
- Annoni M, Borgonovo S, Aralla M. Sentinel lymph node mapping in canine mast cell tumours using a preoperative radiographic indirect lymphography: Technique description and results in 138 cases. *Vet Comp Oncol*. 2023 Sep;21(3):469-481.
- Avallone G, Rasotto R, Chambers JK, Miller AD, Behling-Kelly E, Monti P, Berlato D, Valenti P, Roccabianca P. Review of Histological Grading Systems in Veterinary Medicine. *Vet Pathol*. 2021 Sep;58(5):809-828.
- Baginski H, Davis G, Bastian RP. The prognostic value of lymph node metastasis with grade 2 MCTs in dogs: 55 cases (2001-2010). *J Am Anim Hosp Assoc*. 2014 Mar-Apr;50(2):89-95.
- Bellamy E, Berlato D. Canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours: a narrative review. *J Small Anim Pract*. 2022 Jul;63(7):497-511.
- Berlato D, Bulman-Fleming J, Clifford CA, Garrett L, Intile J, Jones P, Kamstock DA, Liptak JM, Pavuk A, Powell R, Rasotto R. Value, Limitations, and Recommendations for Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Vet Pathol*. 2021 Sep;58(5):858-863.
- Blackwood L, Murphy S, Buracco P, De Vos JP, De Fornel-Thibaud P, Hirschberger J, Kessler M, Pastor J, Ponce F, Savary-Bataille K, Argyle DJ. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet Comp Oncol*. 2012 Sep;10(3):e1-e29.
- Book AP, Fidel J, Wills T, Bryan J, Sellon R, Mattoon J. Correlation of ultrasound findings, liver and spleen cytology, and prognosis in the clinical staging of high metastatic risk canine mast cell tumors. *Vet Radiol Ultrasound*. 2011 Sep-Oct;52(5):548-54.
- Bostock DE. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J Small Anim Pract*. 1973 Jan;14(1):27-41.
- Brissot HN, Edery EG. Use of indirect lymphography to identify sentinel lymph node in dogs: a pilot study in 30 tumours. *Vet Comp Oncol*. 2017 Sep;15(3):740-753.
- Camus MS, Priest HL, Koehler JW, Driskell EA, Rakich PM, Ilha MR, Krimer PM. Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome. *Vet Pathol*. 2016 Nov;53(6):1117-1123.
- Chu ML, Hayes GM, Henry JG, Oblak ML. Comparison of lateral surgical margins of up to two centimeters with margins of three centimeters for achieving tumor-free histologic margins following excision of grade I or II cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2020 Mar 1;256(5):567-572.

- Cino M, Gariboldi EM, Stefanello D, Spindler KP, Ferraris EI, Morello EM, Bertola L, Maniscalco L, Martano M. Ki67 Index in Patnaik Grade 2/Kiupel Low-Grade Canine Cutaneous Mast Cell Tumors with Early Lymph Node Metastasis: A Descriptive Study. *Vet Sci*. 2023 Jul 5;10(7):436.
- Cruz VS, Borges JCA, Nepomuceno LL, Gonçalves PAM, Prado YCL, Bianchi C, Fioravanti MCS, Araújo EG. Histological classification and expression of markers of canine mast cell tumors. *Vet World*. 2020 Aug;13(8):1627-1634.
- De Bonis A, Collivignarelli F, Paolini A, Falerno I, Rinaldi V, Tamburro R, Bianchi A, Terragni R, Gianfelici J, Frescura P, Dolce G, Pagni E, Bucci R, Vignoli M. Sentinel Lymph Node Mapping with Indirect Lymphangiography for Canine Mast Cell Tumour. *Vet Sci*. 2022 Sep 8;9(9):484.
- de Nardi AB, Dos Santos Horta R, Fonseca-Alves CE, de Paiva FN, Linhares LCM, Firmo BF, Ruiz Sueiro FA, de Oliveira KD, Lourenço SV, De Francisco Strefezzi R, Brunner CHM, Rangel MMM, Jark PC, Castro JLC, Ubukata R, Batschinski K, Sobral RA, da Cruz NO, Nishiya AT, Fernandes SC, Dos Santos Cunha SC, Gerardi DG, Challoub GSG, Biondi LR, Laufer-Amorim R, de Oliveira Paes PR, Lavalle GE, Huppés RR, Grandi F, de Carvalho Vasconcellos CH, Dos Anjos DS, Luzo ÂCM, Matera JM, Vozdova M, Dagli MLZ. Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Cells*. 2022 Feb 10;11(4):618.
- Dobson J, Cohen S, Gould S. Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy. *Vet Comp Oncol*. 2004 Sep;2(3):132-41.
- Dobson JM, Scase TJ. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *J Small Anim Pract*. 2007 Aug;48(8):424-31.
- Downing S, Chien MB, Kass PH, Moore PE, London CA. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res*. 2002 Dec;63(12):1718-23.
- Ferrari R, Boracchi P, Chiti LE, Manfredi M, Giudice C, De Zani D, Spediacci C, Recordati C, Grieco V, Gariboldi EM, Stefanello D. Assessing the Risk of Nodal Metastases in Canine Integumentary Mast Cell Tumors: Is Sentinel Lymph Node Biopsy Always Necessary? *Animals (Basel)*. 2021 Aug 11;11(8):2373.
- Ferrari, R, Chiti, LE, Manfredi, M, et al. Biopsy of sentinel lymph nodes after injection of methylene blue and lymphoscintigraphic guidance in 30 dogs with mast cell tumors. *Veterinary Surgery*. 2020; 49: 1099–1108.
- Ferrari R, Marconato L, Buracco P, Boracchi P, Giudice C, Iussich S, Grieco V, Chiti LE, Favretto E, Stefanello D. The impact of extirpation of non-palpable/normal-sized regional lymph nodes on staging of canine cutaneous mast cell tumours: A multicentric retrospective study. *Vet Comp Oncol*. 2018 Dec;16(4):505-510.
- Ferrari, R., Zani, D.D. & Stefanello, D. (2021b) Il linfonodo sentinella: come e perché. La nuova sfida in oncologia chirurgica veterinaria. *Veterinaria* 1, 19–30
- Finora K, Leibman NF, Fettman MJ, Powers BE, Hackett TA, Withrow SJ. Cytological comparison of fine-needle aspirates of liver and spleen of normal dogs and of dogs with cutaneous mast cell tumours

- and an ultrasonographically normal appearing liver and spleen. *Vet Comp Oncol.* 2006 Sep;4(3):178-83.
- Forte A, Leonetti G, Bosco M, Manfredelli S, De Sanctis R, Urbano V, Bezzi M. Significato biologico delle micrometastasi linfonodali e del concetto di linfonodo sentinella [The clinical significance of lymph node micrometastases and of concept of sentinel lymph node]. *G Chir.* 2006 Jun-Jul;27(6-7):277-80. Italian.
- Fournier Q, Thierry F, Longo M, Malbon A, Cazzini P, Bisson J, Woods S, Liuti T, Bavcar S. Contrast-enhanced ultrasound for sentinel lymph node mapping in the routine staging of canine mast cell tumours: A feasibility study. *Vet Comp Oncol.* 2021 Sep;19(3):451-462.
- Fulcher RP, Ludwig LL, Bergman PJ, Newman SJ, Simpson AM, Patnaik AK. Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2006 Jan 15;228(2):210-5.
- Garrett LD. Canine mast cell tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. *Vet Med (Auckl).* 2014 Aug 12;5:49-58.
- Gill V, Leibman N, Monette S, Craft DM, Bergman PJ. Prognostic Indicators and Clinical Outcome in Dogs with Subcutaneous Mast Cell Tumors Treated with Surgery Alone: 43 Cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2020 Jul/Aug;56(4):215-225.
- Grimes JA, Secrest SA, Wallace ML, Laver T, Schmiedt CW. Use of indirect computed tomography lymphangiography to determine metastatic status of sentinel lymph nodes in dogs with a pre-operative diagnosis of melanoma or mast cell tumour. *Vet Comp Oncol.* 2020 Dec;18(4):818-824.
- Grimes JA, Secrest SA, Northrup NC, Saba CF, Schmiedt CW. Indirect computed tomography lymphangiography with aqueous contrast for evaluation of sentinel lymph nodes in dogs with tumors of the head. *Vet Radiol Ultrasound.* 2017 Sep;58(5):559-564.
- Guerra D, Faroni E, Sabattini S, Agnoli C, Chalfon C, Stefanello D, Del Magno S, Cola V, Grieco V, Marconato L. Histologic grade has a higher-weighted value than nodal status as predictor of outcome in dogs with cutaneous mast cell tumours and overtly metastatic sentinel lymph nodes. *Vet Comp Oncol.* 2022 Sep;20(3):551-558.
- Hergt F, von Bomhard W, Kent MS, Hirschberger J. Use of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors on cytology specimens. *Vet Clin Pathol.* 2016 Sep;45(3):477-83.
- Horta RS, Lavalley GE, Monteiro LN, Souza MCC, Cassali GD, Araújo RB. Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Vet Pathol.* 2018 Mar;55(2):212-223.
- Howard EB, Sawa TR, Nielsen SW, Kenyon AJ. Mastocytoma and gastroduodenal ulceration. Gastric and duodenal ulcers in dogs with mastocytoma. *Pathol Vet.* 1969;6(2):146-58.
- Kiupel M, Camus M. Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2019 Sep;49(5):819-836.
- Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, DeLay J, Detrisac CJ, Fitzgerald SD, Gamble D, Ginn PE, Goldschmidt MH, Hendrick MJ, Howerth EW, Janovitz EB, Langohr I, Lenz SD, Lipscomb TP, Miller

- MA, Misdorp W, Moroff S, Mullaney TP, Neyens I, O'Toole D, Ramos-Vara J, Scase TJ, Schulman FY, Sledge D, Smedley RC, Smith K, W Snyder P, Southorn E, Stedman NL, Steficek BA, Stromberg PC, Valli VE, Weisbrode SE, Yager J, Heller J, Miller R. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol.* 2011 Jan;48(1):147-55.
- Kiupel M, Webster JD, Miller RA, Kaneene JB. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2005 Aug;52(6):280-6.
- Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol.* 2004 Jul;41(4):371-7.
- Kosanovich Cahalane A, Payne S, Barber LG, Duda LE, Henry CJ, Mauldin GE, Frimberger AE, Cotter SM, Moore AS. Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2004 Aug 1;225(3):401-8.
- Krick EL, Billings AP, Shofer FS, Watanabe S, Sorenmo KU. Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. *Vet Comp Oncol.* 2009 Jun;7(2):130-8.
- Ku CK, Kass PH, Christopher MM. Cytologic-histologic concordance in the diagnosis of neoplasia in canine and feline lymph nodes: a retrospective study of 367 cases. *Vet Comp Oncol.* 2017 Dec;15(4):1206-1217.
- Lapsley J, Hayes GM, Janvier V, Newman AW, Peters-Kennedy J, Balkman C, Sumner JP, Johnson P. Influence of locoregional lymph node aspiration cytology vs sentinel lymph node mapping and biopsy on disease stage assignment in dogs with integumentary mast cell tumors. *Vet Surg.* 2021 Jan;50(1):133-141.
- London, C.A. & Thamm, D.H. (2020) *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 6th ed. Elsevier.
- Lowe R, Gavazza A, Impellizeri JA, Soden DM, Lubas G. The treatment of canine mast cell tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. *Vet Comp Oncol.* 2017 Sep;15(3):775-784.
- MacNeill AL. Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. *Top Companion Anim Med.* 2011 May;26(2):62-76.
- Maglennon GA, Murphy S, Adams V, Miller J, Smith K, Blunden A, Scase TJ. Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol.* 2008 Dec;6(4):268-74.
- Marconato, L. (2020) Mastocitoma cutaneo del cane: cosa propone il patologo, cosa serve al clinico
MyLAV *Blog.*
<https://www.mylavblog.net/attachments/article/302/Linee%20guida%20mastocitoma%20dermico%20MYLAV%202020.pdf>

- Marconato, L., Ferrari, R., Rossi, F., *et al.* (2022a) Linee guida SIONCOV 2022 per la stadiazione del mastocitoma cutaneo e sottocutaneo del cane. *Veterinaria* 5(36), 197–206
- Marconato, L., Ferrari, R., Rossi, F., *et al.* (2022b) Linee guida SIONCOV 2022 per il trattamento e la diagnosi istopatologica del mastocitoma cutaneo e sottocutaneo del cane. *Veterinaria* 5(36), 209–221
- Marconato, L. & Foglia, A. (2021) The regional lymph node in veterinary oncology: under special surveillance. *Veterinary oncology* 35, 5–12
- Marconato L, Stefanello D, Kiupel M, Finotello R, Polton G, Massari F, Ferrari R, Agnoli C, Capitani O, Giudice C, Aresu L, Vasconi ME, Rigillo A, Sabattini S. Adjuvant medical therapy provides no therapeutic benefit in the treatment of dogs with low-grade mast cell tumours and early nodal metastasis undergoing surgery. *Vet Comp Oncol.* 2020 Sep;18(3):409-415.
- Martins AL, Carvalho FF, Mesquita JR, Gärtner F, Amorim I. Analysis of risk factors for canine mast cell tumors based on the Kiupel and Patnaik grading system among dogs with skin tumors. *Open Vet J.* 2021 Oct-Dec;11(4):619-634.
- Mendez SE, Drobatz KJ, Duda LE, White P, Kubicek L, Sorenmo KU. Treating the locoregional lymph nodes with radiation and/or surgery significantly improves outcome in dogs with high-grade mast cell tumours. *Vet Comp Oncol.* 2020 Jun;18(2):239-246.
- Miller DM. The occurrence of mast cell tumors in young Shar-Peis. *J Vet Diagn Invest.* 1995 Jul;7(3):360-3.
- Mir, L.M., Gehl, J., Sersa, G., *et al.* (2006) Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *European Journal of Cancer Supplements* 4, 14–25
- Misdorp W. Mast cells and canine mast cell tumours. A review. *Vet Q.* 2004 Dec;26(4):156-69.
- Mochizuki H, Motsinger-Reif A, Bettini C, Moroff S, Breen M. Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol.* 2017 Sep;15(3):829-839.
- Moore AS, Frimberger AE, Taylor D, Sullivan N. Retrospective outcome evaluation for dogs with surgically excised, solitary Kiupel high-grade, cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol.* 2020 Sep;18(3):402-408.
- Mullins MN, Dernell WS, Withrow SJ, Ehrhart EJ, Thamm DH, Lana SE. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). *J Am Vet Med Assoc.* 2006 Jan 1;228(1):91-5.
- Murphy S, Sparkes AH, Blunden AS, Brearley MJ, Smith KC. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. *Vet Rec.* 2006 Mar 4;158(9):287-91.
- Newman SJ, Mrkonjich L, Walker KK, Rohrbach BW. Canine subcutaneous mast cell tumour: diagnosis and prognosis. *J Comp Pathol.* 2007 May;136(4):231-9.

- O'Connell K, Thomson M. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. *Vet Comp Oncol.* 2013 Mar;11(1):51-62.
- Oliveira MT, Campos M, Lamego L, Magalhães D, Menezes R, Oliveira R, Patanita F, Ferreira DA. Canine and Feline Cutaneous Mast Cell Tumor: A Comprehensive Review of Treatments and Outcomes. *Top Companion Anim Med.* 2020 Nov;41:100472.
- Owen, L.N., Unit, W.H.Organization.V.P.H. & Oncology, W.H.O.C.C. for C. (1980) TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/ edited by L.N. Owen.
- Paes PRO, Horta RS, Luza LC, Pierezan F, Costa MP, Lavallo GE. Inclusion of fibroblasts and collagen fibrils in the cytologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Clin Pathol.* 2022 Sep;51(3):339-348.
- Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol.* 1984 Sep;21(5):469-74.
- Pecceu E, Serra Varela JC, Handel I, Piccinelli C, Milne E, Lawrence J. Ultrasound is a poor predictor of early or overt liver or spleen metastasis in dogs with high-risk mast cell tumours. *Vet Comp Oncol.* 2020 Sep;18(3):389-401.
- Pratschke KM, Atherton MJ, Sillito JA, Lamm CG. Evaluation of a modified proportional margins approach for surgical resection of mast cell tumors in dogs: 40 cases (2008-2012). *J Am Vet Med Assoc.* 2013 Nov 15;243(10):1436-41.
- Preziosi R, Morini M, Sarli G. Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. *J Vet Diagn Invest.* 2004 Nov;16(6):554-61.
- Preziosi R, Sarli G, Paltrinieri M. Multivariate survival analysis of histological parameters and clinical presentation in canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Res Commun.* 2007 Apr;31(3):287-96.
- Randall EK, Jones MD, Kraft SL, Worley DR. The development of an indirect computed tomography lymphography protocol for sentinel lymph node detection in head and neck cancer and comparison to other sentinel lymph node mapping techniques. *Vet Comp Oncol.* 2020 Dec;18(4):634-644.
- Ribeiro PR, Bianchi MV, Bandinelli MB, Rosa RB, Echenique JVZ, Serpa Stolf A, Driemeier D, Sonne L, Pavarini SP. Pathological aspects of cutaneous mast cell tumors with metastases in 49 dogs. *Vet Pathol.* 2022 Nov;59(6):922-930.
- Rinaldi V, Crisi PE, Vignoli M, Pierini A, Terragni R, Cabibbo E, Boari A, Finotello R. The Role of Fine Needle Aspiration of Liver and Spleen in the Staging of Low-Grade Canine Cutaneous Mast Cell Tumor. *Vet Sci.* 2022 Sep 1;9(9):473.
- Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF, London CA. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol.* 2007 May;44(3):335-41.
- Rossi F, Körner M, Suárez J, Carozzi G, Meier VS, Roos M, Rohrer Bley C. Computed tomographic-lymphography as a complementary technique for lymph node staging in dogs with malignant tumors of various sites. *Vet Radiol Ultrasound.* 2018 Mar;59(2):155-162.

- Sabattini S, Faroni E, Renzi A, Ghisoni G, Rigillo A, Bettini G, Pasquini A, Zanardi S, Guerra D, Marconato L. Longitudinal lymph node step-sectioning for the identification of metastatic disease in canine mast cell tumor. *Vet Pathol.* 2022 Sep;59(5):768-772.
- Sabattini S, Scarpa F, Berlato D, Bettini G. Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3? *Vet Pathol.* 2015 Jan;52(1):70-3.
- Saunders H, Thomson MJ, O'Connell K, Bridges JP, Chau L. Evaluation of a modified proportional margin approach for complete surgical excision of canine cutaneous mast cell tumours and its association with clinical outcome. *Vet Comp Oncol.* 2021 Dec;19(4):604-615.
- Scarpa F, Sabattini S, Bettini G. Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol.* 2016 Sep;14(3):245-51.
- Scase TJ, Edwards D, Miller J, Henley W, Smith K, Blunden A, Murphy S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J Vet Intern Med.* 2006 Jan-Feb;20(1):151-8.
- Shoop SJ, Marlow S, Church DB, English K, McGreevy PD, Stell AJ, Thomson PC, O'Neill DG, Brodbelt DC. Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. *Canine Genet Epidemiol.* 2015 Jan 26;2:1.
- Simoes JP, Schoning P, Butine M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet Pathol.* 1994 Nov;31(6):637-47.
- Simpson AM, Ludwig LL, Newman SJ, Bergman PJ, Hottinger HA, Patnaik AK. Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2004 Jan 15;224(2):236-40.
- Sledge DG, Webster J, Kiupel M. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *Vet J.* 2016 Sep;215:43-54.
- Śmiech A, Łopuszyński W, Ślaska B, Bulak K, Jasik A. Occurrence and Distribution of Canine Cutaneous Mast Cell Tumour Characteristics Among Predisposed Breeds. *J Vet Res.* 2019 Mar 22;63(1):141-148.
- Śmiech A, Ślaska B, Łopuszyński W, Jasik A, Bochyńska D, Dąbrowski R. Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification. *Acta Vet Scand.* 2018 Nov 3;60(1):70.
- Śmiech A, Ślaska B, Łopuszyński W, Jasik A, Szczepanik M, Wilkołek P. Epidemiological Study of Canine Mast Cell Tumours According to the Histological Malignancy Grade. *Pol J Vet Sci.* 2017 Sep 26;20(3):455-465.
- Soultani C, Patsikas MN, Karayannopoulou M, Jakovljevic S, Chrysosgonidis I, Papazoglou L, Papaioannou N, Papadopoulou P, Pavlidou K, Ilia GM, Kaitzis DG, Ilia TM. Assessment of sentinel lymph node metastasis in canine mammary gland tumors using computed tomography indirect lymphography. *Vet Radiol Ultrasound.* 2017 Mar;58(2):186-196.

- Spugnini EP, Vincenzi B, Citro G, Dotsinsky I, Mudrov T, Baldi A. Evaluation of Cisplatin as an electrochemotherapy agent for the treatment of incompletely excised mast cell tumors in dogs. *J Vet Intern Med.* 2011 Mar-Apr;25(2):407-11.
- Stefanello D, Buracco P, Sabattini S, Finotello R, Giudice C, Grieco V, Iussich S, Tursi M, Scase T, Di Palma S, Bettini G, Ferrari R, Martano M, Gattino F, Marrington M, Mazzola M, Elisabetta Vasconi M, Annoni M, Marconato L. Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009-2014). *J Am Vet Med Assoc.* 2015 Apr 1;246(7):765-9.
- Stefanello D. & Ferrari R. (2016) Lo staging clinico del mastocitoma del cane: una valutazione del paziente a 360°. *Veterinaria* 30, 17–28
- Stefanello D, Valenti P, Faverzani S, Bronzo V, Fiorbianco V, Pinto da Cunha N, Romussi S, Cantatore M, Caniatti M. Ultrasound-guided cytology of spleen and liver: a prognostic tool in canine cutaneous mast cell tumor. *J Vet Intern Med.* 2009 Sep-Oct;23(5):1051-7.
- Suami H, Yamashita S, Soto-Miranda MA, Chang DW. Lymphatic territories (lymphosomes) in a canine: an animal model for investigation of postoperative lymphatic alterations. *PLoS One.* 2013 Jul 24;8(7):e69222.
- Takahashi T, Kadosawa T, Nagase M, Matsunaga S, Mochizuki M, Nishimura R, Sasaki N. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). *J Am Vet Med Assoc.* 2000 Jan 15;216(2):222-6.
- Tamlin VS, Bottema CDK, Woolford L, Dobson EC, Kessell AE, Peaston AE. Canine mast cell tumours part I: Clinical and survival outcomes. *Vet Med Sci.* 2022 Jul;8(4):1409-1420.
- Thompson JJ, Pearl DL, Yager JA, Best SJ, Coomber BL, Foster RA. Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. *Vet Pathol.* 2011 Jan;48(1):156-68.
- Vascellari M, Giantin M, Capello K, Carminato A, Morello EM, Vercelli A, Granato A, Buracco P, Dacasto M, Mutinelli F. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. *Vet Pathol.* 2013 Jan;50(1):110-21.
- Villamil JA, Henry CJ, Bryan JN, Ellersieck M, Schultz L, Tyler JW, Hahn AW. Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. *J Am Vet Med Assoc.* 2011 Oct 1;239(7):960-5.
- Wan J, Oblak ML, Ram A, Singh A, Nykamp S. Determining agreement between preoperative computed tomography lymphography and indocyanine green near infrared fluorescence intraoperative imaging for sentinel lymph node mapping in dogs with oral tumours. *Vet Comp Oncol.* 2021 Jun;19(2):295-303.
- Warland J, Amores-Fuster I, Newbury W, Brearley M, Dobson J. The utility of staging in canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol.* 2014 Dec;12(4):287-98.
- Warland J, Dobson J. Breed predispositions in canine mast cell tumour: a single centre experience in the United Kingdom. *Vet J.* 2013 Aug;197(2):496-8.

- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol.* 2007 May;44(3):298-308.
- Weishaar KM, Thamm DH, Worley DR, Kamstock DA. Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. *J Comp Pathol.* 2014 Nov;151(4):329-38.
- Welle MM, Bley CR, Howard J, Rüfenacht S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet Dermatol.* 2008 Dec;19(6):321-39.
- White CR, Hohenhaus AE, Kelsey J, Procter-Gray E. Cutaneous MCTs: associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2011 May-Jun;47(3):210-6.
- Willmann M, Yuzbasiyan-Gurkan V, Marconato L, Dacasto M, Hadzijusufovic E, Hermine O, Sadovnik I, Gamperl S, Schneeweiss-Gleixner M, Gleixner KV, Böhm T, Peter B, Eisenwort G, Moriggl R, Li Z, Jawhar M, Sotlar K, Jensen-Jarolim E, Sexl V, Horny HP, Galli SJ, Arock M, Vail DM, Kiupel M, Valent P. Proposed Diagnostic Criteria and Classification of Canine Mast Cell Neoplasms: A Consensus Proposal. *Front Vet Sci.* 2021 Dec 10;8:755258.
- Worley DR. Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. *Vet Comp Oncol.* 2014 Sep;12(3):215-26.
- Zavodovskaya R, Chien MB, London CA. Use of kit internal tandem duplications to establish mast cell tumor clonality in 2 dogs. *J Vet Intern Med.* 2004 Nov-Dec;18(6):915-7.