

Lo staging clinico del mastocitoma del cane: una valutazione del paziente a 360°



La diagnosi certa e l'identificazione delle variabili cliniche, patologiche e molecolari predittive di un comportamento metastatico del mastocitoma canino servono a indirizzare il clinico ad eseguire precisi atti, come il campionamento citologico e/o istologico degli organi bersaglio (linfonodi regionali, linfonodi a distanza, milza, fegato, sangue periferico e midollo osseo) per la ricerca precoce di metastasi, le quali si associano a una riduzione dei tempi di sopravvivenza. Una diagnosi certa della malattia metastatica al linfonodo regionale e/o a distanza, soprattutto se precoce, consente il corretto inquadramento oncologico della malattia, l'impostazione di una più efficace terapia calibrata sul singolo paziente e una corretta ed esaustiva comunicazione con il proprietario.



Damiano Stefanello*
Med Vet, PhD



Roberta Ferrari
Med Vet

Il mastocitoma è un tumore maligno a cellule rotonde ben conosciuto dal medico veterinario sia per il suo frequente riscontro nella specie canina (in particolare la forma cutanea singola e multipla), sia perché la comunità scientifica nazionale e internazionale è da lungo tempo impegnata su questo argomento.^{1,2} A conferma della centralità di questa neoplasia nella pratica clinica, si riscontra anche l'importante investimento scientifico e tecnologico dedicato negli ultimi 10 anni da alcune aziende farmaceutiche per la sintesi di farmaci chemioterapici a bersaglio (inibitori tirosinchinasici a basso peso molecolare, quali masitinib e toceranib) per il trattamento del mastocitoma canino.^{3,4} Tali importanti e nuove acquisizioni scientifiche, ottenute negli ultimi 15 anni nei diversi settori della ricerca veterinaria (clinica, patologica, molecolare-genetica), ci consentono oggi di disporre di un nuovo bagaglio di conoscenze, che ci permette un approccio oncologico più consapevole, più articolato, più calibrato e personalizzato sul singolo paziente e sicuramente più aggiornato, rispetto alle indicazioni prognostiche riportate nel lavoro di Patnaik e

colleghi pubblicato nel 1984, che per almeno 25 anni ha guidato pressoché in solitaria il medico veterinario nella gestione clinica del mastocitoma canino.^{2,5} Per i motivi appena accennati il tema centrale di questo articolo sarà la stadiazione del mastocitoma nella specie canina, un argomento di recente discussione in ambito scientifico sia nazionale sia internazionale, che non

La diagnosi di metastasi linfonodale e a distanza è fondamentale per conoscere la prognosi nel singolo cane e per la corretta indicazione al trattamento oncologico.

deve però identificarsi unicamente con procedure diagnostico-strumentali ben definite per la ricerca della malattia metastatica loco-regionale e a distanza, ma deve rifarsi ad un approccio clinico di più ampio respiro, che guidi il medico veterinario nella valutazione prognostica a 360° del paziente oncologico canino affetto da mastocitoma, affinché le scelte terapeutiche e

Tabella 1 - Lista dei fattori prognostici che si associano più frequentemente a prognosi sfavorevole	
FATTORI PROGNOSTICI NEGATIVI	
Variabili cliniche	Variabili patologiche
Localizzazione muco-cutanea o viscerale	Grado istologico III (Patnaik et al, 1984 ⁵)
Razza Shar-pei	Alto grado (Kiupel et al, 2011 ¹⁹)
Dimensioni > 3 cm	Indice mitotico elevato
Ulcerazione	Ki67 elevato
Segni sistemici (anoressia, vomito, melena)	Espressione immunostochimica intracitoplasmatica della proteina KIT
Recidiva locale	Presenza di mutazioni del gene c-KIT (analisi PARR)
Linfonadenomegalia regionale	

le relative ricadute prognostiche, siano sempre contestualizzate e rispondano ad una precisa indicazione clinica.^{2,6-11} Recentissime ricerche hanno dimostrato quanto il ruolo prognostico del grading istopatologico, sia esso espresso secondo lo studio di Patnaik e colleghi (1984) sia secondo il più recente lavoro di Kiupel e colleghi (2011), risulti uno strumento oggettivo di valutazione prognostica che non consente tuttavia da solo di escludere la presenza/assenza di metastasi loco-regionali e a distanza.¹² La diagnosi certa di malattia metastatica, sia al linfonodo regionale sia a distanza, si rende sempre più indispensabile visto il ruolo cruciale della diffusione metastatica, nel decretare la prognosi del paziente e nello stabilire il corretto approccio terapeutico sia esso chirurgico, piuttosto che chemioterapico, radioterapico o la combinazione di questi.^{2,6-11,13,14} Il processo di stadiazione del mastocitoma nel cane prevede di conoscere ed indentificare in ogni paziente tutte le variabili cliniche-patologiche-molecolari che la ricerca ha identificato come prognostiche, per consentire la costruzione di un profilo oncologico calibrato sul singolo caso clinico (Tabella 1).^{2,5,10-12,15-22}

La corretta costruzione di un profilo clinico-prognostico del singolo caso oncologico ha indubbi vantaggi nell'identificare il trattamento corretto da proporre e nel favorire la comunicazione con il proprietario relativamente ai costi da sostenere, all'impegno richiesto e ai risultati attesi.

IDENTIFICAZIONE DELLE VARIABILI PROGNOSTICHE PREDITTIVE DI METASTASI DEDUCIBILI DALLA VISITA CLINICA

Il mastocitoma canino può manifestarsi clinicamente in quattro presentazioni: mastocitoma cutaneo singolo (Figura 1), mastocitoma cutaneo multiplo, mastocitoma muco-cutaneo (Figura 2) e mastocitoma primariamente viscerale (Figura 3).¹ Il mastocitoma cutaneo singolo rappresenta la forma clinica più frequentemente osservata nel cane con un'incidenza del 16-21% tra le neoplasie cutanee e sottocutanee di questa specie.¹ Il

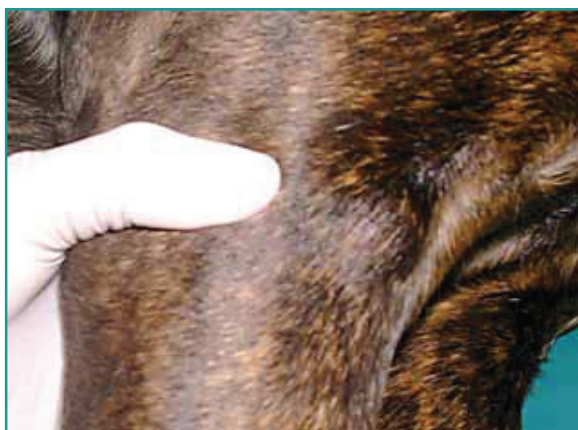


Figura 1 - Cane boxer, femmina sterilizzata di 7 anni. Mastocitoma cutaneo singolo localizzato nella porzione volare della regione del gomito destro.



Figura 2 - Cane pastore maremmano, maschio intero di 8 anni. Mastocitoma muco-cutaneo della regione labiale inferiore destra.

potenziale metastatico dei mastocitomi cutanei singoli è stato storicamente correlato unicamente al grado istologico secondo la classificazione di Patnaik e colleghi (1984), che segnalava un'incidenza di metastasi più elevata nei mastocitomi di terzo grado e pressoché assente in quelli di primo grado.⁵ Tuttavia in un recente lavoro è stato evidenziato come anche i mastocitomi cutanei alla prima presentazione di basso grado secondo Kiupel e colleghi (2011) e/o di I-II grado secondo la classificazione di Patnaik e colleghi (1984) presentavano un tasso di metastasi al linfonodo regionale e a distanza rispettivamente del 18,1% e del 4,1%.¹² Questi dati di recente

I mastocitomi muco-cutanei e viscerali hanno potenziale metastatico superiore rispetto a mastocitomi cutanei singoli e multipli.

pubblicazione sono i primi a dimostrare come il solo grado istologico in assenza di una valutazione della malattia metastatica negli organi bersaglio (linfonodo regionale, milza, fegato, midollo osseo), non sia in grado di identificare precocemente i pazienti a prognosi infausta. I mastocitomi cutanei multipli, siano essi ad insorgenza contemporanea o meno, hanno una frequenza clinica del 9-21% e ad oggi non ci sono lavori che ne attestino le percentuali di metastasi loco-regionali e a distanza.¹ La stadiazione clinica del mastocitoma pubblicata



Figura 3 - Cane golden retriever, femmina sterilizzata di 5 anni. Mastocitoma viscerale linguale. Sono presenti due punti di sutura apposti dopo biopsia incisionale.

dalla World Health Organization (WHO) colloca pazienti con mastocitomi multipli all'interno del III stadio, conferendo ad essi una prognosi meno favorevole rispetto a quelli con coinvolgimento linfonodale (stadio II - Tabella 2),²³ a dispetto tuttavia di una letteratura che, seppur povera, ne delinea un comportamento biologico meno maligno, caratterizzato da pazienti con un elevato numero di mastocitomi di basso grado.^{15,24,25}

Tabella 2 - Stadi clinici del mastocitoma secondo la World Health Organization.²³ Si riporta in aggiunta la descrizione delle procedure cliniche necessarie a definire lo stadio clinico		
Stadio	Definizione	Procedure diagnostiche richieste
0	Mastocitoma asportato incompletamente senza coinvolgimento linfonodale*	- Valutazione istopatologica dei margini di escissione chirurgica - Valutazione citologica ¹⁰ e/o istologica ¹¹ del linfonodo regionale. La valutazione istologica è sempre da preferire.
I	Mastocitoma singolo localizzato al derma, senza coinvolgimento linfonodale*	- Valutazione istologica sulla massa escissa - Valutazione citologica ¹⁰ e/o istologica ¹¹ del linfonodo regionale. La valutazione istologica è sempre da preferire.
II	Mastocitoma singolo localizzato al derma, con coinvolgimento linfonodale*	- Valutazione istologica sulla massa escissa - Valutazione citologica ¹⁰ e/o istologica ¹¹ del linfonodo regionale. La valutazione istologica è sempre da preferire.
III	Mastocitoma multiplo o MCT singolo infiltrante con o senza coinvolgimento linfonodale*	- Valutazione clinica accompagnata da diagnosi citologica. La valutazione istologica è da preferire nella definizione di mastocitoma infiltrante. - Valutazione citologica ¹⁰ e/o istologica ¹¹ del linfonodo regionale. La valutazione istologica è sempre da preferire.
IV	Qualsiasi mastocitoma con metastasi a distanza o recidiva con metastasi (incluso coinvolgimento di sangue e midollo osseo)*	Diagnosi citologica di metastasi negli organi bersaglio secondo quanto pubblicato. ^{6,8,9}
	* ogni stadio può essere suddiviso in: a = senza sintomi sistemici b = con sintomi sistemici	I sintomi possono riferirsi ai segni di Darier (edema, prurito, eritema) locali o sistemici, vomito diarrea, sincopi

Inoltre si sottolinea come nel cane con mastocitoma multiplo contemporaneo siano le caratteristiche clinico-patologiche del singolo mastocitoma a decretare il profilo prognostico, indipendentemente dal numero dei mastocitomi presenti. Il mastocitoma muco-cutaneo, con sviluppo a livello delle giunzioni muco-cutanee labiali, palpebrali, prepuziali, vulvari e del letto subungueale, non è di frequente riscontro e ad oggi non si dispone di una precisa incidenza clinica; tuttavia è ampiamente condiviso che abbiano una maggiore tendenza alla diffusione metastatica in presenza di un coinvolgimento dei linfonodi regionali.^{2,16,17,26}

I mastocitomi primariamente viscerali sono stati riportati più frequentemente nelle razze toy ma sono considerati rari, seppur caratterizzati sempre da una frequente disseminazione metastatica sistemica, che si associa a ridotti tempi di sopravvivenza e prognosi infausta.²⁷⁻³⁰

La raccolta dei dati del paziente per la compilazione della cartella clinica inizia come sempre dal segnalamento del paziente. Sebbene il mastocitoma venga riportato più frequentemente in cani di razza golden e labrador retriever, boxer e setter inglesi, lo sviluppo del mastocitoma cutaneo nella razza shar-pei si associa più frequentemente ad un comportamento più aggressivo e prognosi sfavorevole.^{1,12}

Nella raccolta delle informazioni anamnestiche nel corso della valutazione clinica bisogna accertarsi del fatto che si tratti o meno di una recidiva locale (Figura 4), variabile di per sé altamente prognostica e correlata spesso ad una potenziale diffusione metastatica.¹ Per recidiva locale s'intende il ritorno della malattia entro 2 centimetri dalla pregressa sede anatomica d'insorgenza

dopo trattamento sia esso chirurgico, chemioterapico (ivi compresi i trattamenti cortisonici) e radioterapico.³¹ La valutazione clinica del paziente attraverso l'esame obiettivo generale e l'esame obiettivo particolare consente di raccogliere informazioni cliniche associate più frequentemente a disseminazione metastatica loco-regionale e a distanza quali: dimensioni, presenza di noduli satelliti, ulcerazione, infiammazione, segni e sintomi correlabili a malattia metastatica in corso.

Mastocitomi di dimensioni superiori ai 3 cm di diametro (Figura 5) o a crescita irregolare, con infiltrazione dei tessuti sani circostanti, si associano infatti più frequentemente a metastasi loco-regionali e a distanza, così come alla presenza di noduli satelliti (Figura 6) distribuiti in modo disordinato attorno alla massa principale o lungo la rete linfatica afferente al linfonodo regionale.^{1,2,12,32} Come già riportato in precedenza, nel corso della visita clinica si deve prestare attenzione al

Sede, dimensione, ulcerazione, segni di Darier, coinvolgimento linfonodale e recidiva locale sono variabili cliniche associate a metastasi loco-regionali e a diffusione sistemica.

fatto che la massa neoplastica sia o meno ulcerata; in presenza di ulcerazione è frequente riscontrare inoltre eritema ed edema perilesionale, effetti locali dovuti alla liberazione di istamina e di altre amine vasoattive (Figura 8) contenute all'interno dei granuli citoplasmatici presenti in alto numero nei mastociti neoplastici (effetti



Figura 4 - Cane boxer, femmina sterilizzata di 8 anni. Recidiva locale di mastocitoma della regione del garretto sinistro in corrispondenza della cicatrice chirurgica. Si nota eritema attorno alla recidiva e un'evidente tumefazione della regione della coscia dovuta ad edema secondario alla degranolazione dei mastociti.



Figura 5 - Cane dogo argentino, maschio intero di 5 anni. Voluminoso mastocitoma cutaneo della regione del garretto, con ulcerazione secondaria a biopsia incisionale.



Figura 6 - Cane american staffordshire terrier, femmina intera di 7 anni. Presentazione clinica a noduli satelliti. Si riconoscono numerosi noduli di forma e dimensione diversa in prossimità del mastocitoma principale a sede vulvare.



Figura 8 - Cane beagle, maschio di 8 anni. Voluminoso mastocitoma a crescita irregolare con evidente eritema locale localizzato in prossimità della regione inguinale destra.



Figura 7 - Cane golden retriever, maschio intero 8 anni. Voluminoso e ulcerato mastocitoma digitale.

locali noti anche come “segni di Darier”). La degranulazione può causare anche manifestazioni sistemiche quali vomito, diarrea, sincopi e shock ipotensivi che si configurano come vere e proprie sindromi paraneoplastiche e che sono spesso predittive di una diffusione metastatica, che deve essere pertanto indagata nei pazienti che manifestano tale sintomatologia.^{1,2,12,15} L'esame obiettivo particolare del linfonodo regionale

rappresenta uno step di fondamentale importanza della visita e della stadiazione del mastocitoma in quanto una sua positività citologica¹⁰ e/o istologica¹¹ deve portare il clinico ad indagare una più probabile disseminazione metastatica a distanza.¹⁸ Inoltre, il coinvolgimento linfonodale rappresenta, anche in assenza di un coinvolgimento sistemico, un fattore prognostico negativo in grado di influenzare la sopravvivenza (i cani con coinvolgimento del linfonodo regionale vivono meno dei cani senza il coinvolgimento linfonodale) e il piano terapeutico, dato che con metastasi linfonodale la chemioterapia è sempre da suggerire.^{10,14,24,32,33}

IDENTIFICAZIONE DELLE VARIABILI PROGNOSTICHE PATOLOGICHE E MOLECOLARI PREDITTIVE DI METASTASI

Nella valutazione del paziente oncologico e nello specifico del paziente affetto da mastocitoma la formulazione della prognosi non si conclude con la sola visita clinica. Infatti, numerose informazioni ottenute con la valutazione citologica, istologica, immunoistochimica e molecolare del tumore consentono una caratterizzazione prognostica migliore e più dettagliata. È indubbio che alcune di queste variabili prognostiche richiedano, per essere riconosciute, procedure di campionamento citologico e istologico e che alcune di esse si avvalgano di metodologie diagnostiche non ancora diffusamente in tutti i laboratori di analisi veterinarie. Malgrado questo, è fondamentale nella stadiazione del mastocitoma avere un'idea ben chiara di quali test sono disponibili per predire il risultato oncologico nel breve, medio e lungo periodo.

Tra le informazioni prognostiche, il grading istologico è in assoluto quella più utilizzata in ambito clinico.² Questo dato è disponibile dopo rimozione completa del mastocitoma o dopo biopsia incisionale e ad oggi si avvale di due distinti sistemi classificativi: quello di Patnaik e colleghi (1984) che identifica tre gradi istologici, e quello di Kiupel e colleghi (2011) che suddivide il mastocitoma in due gradi istologici.^{5,19} Nella pratica clinica degli ultimi 25 anni spesso il medico veterinario procedeva all'escissione della neoplasia e consigliava di procedere con la stadiazione oncologica solo in presenza di mastocitomi di alto grado. Questo modus operandi deve però essere rivisto alla luce di recenti pubblicazioni che hanno dimostrato come il basso grado della più recente classificazione di Kiupel e colleghi (2011) e il grado I e II del più collaudato sistema di Patnaik e colleghi (1984) possano comunque essere esposti al rischio di disseminazione metastatica anche in pazienti con mastocitomi mai trattati prima.¹² Patnaik e colleghi (1984) proposero una classificazione in tre

La prognosi dei mastocitomi cutanei non deve tenere conto solo del grado istologico, indipendentemente dal sistema di grading utilizzato, ma anche dei risultati della stadiazione clinica.

gradi: grado I (basso grado), grado II (grado intermedio) e grado III (alto grado).⁵ È risaputo che la probabilità di sviluppare metastasi nel tempo del grado I non sia superiore al 10%, che il grado II abbia un comportamento imprevedibile con una probabilità di metastasi del 5-22%, mentre i pazienti con grado III abbiano una probabilità di metastasi del 80%.^{1,2,34} La nuova classificazione di Kiupel e colleghi del 2011 che identificava solo due gradi (alto e basso) è stata introdotta con l'intento di individuare più facilmente i pazienti a prognosi peggiore evitando, o meglio, riducendo la scarsa ripetibilità spesso attribuita al sistema classificativo di Patnaik e colleghi (1984), soprattutto in merito alla prognosi mal definita e poco chiara da attribuire ai mastocitomi di grado intermedio (grado II).^{19,35,36} Tuttavia anche per la classificazione di Kiupel e colleghi (2011) è importante sottolineare come la probabilità di metastasi (loco-regionali e a distanza), pur essendo sicuramente più elevata nei mastocitomi di alto grado (30,8%), non si azzera in quelli di basso grado (14,9%).¹² Pertanto, la prognosi non deve basarsi solo sul grado istologico ma deve tenere conto delle informazioni derivanti dalla stadiazione clinica. Grado istologico e stadiazione clinica congiuntamente serviranno a pianificare il trattamento postchirurgico (solo locale Vs locale+sistemico Vs solo sistemico). La diagnosi citologica di mastocitoma (mastocitoma ben differenziato,

moderatamente differenziato e indifferenziato) non ha alcuna ricaduta prognostica e pertanto ad oggi, il clinico non può recuperare alcuna informazione prognostica da questo esame. Recentemente uno studio valutava la capacità di predire citologicamente il grado istologico sfruttando parametri patologici già presenti nella classificazione istologica proposta da Kiupel e colleghi (2011) e che sono riconoscibili anche nella valutazione citologica; tuttavia la sottostima del grado istologico evidenziata in alcuni casi in questo studio non lo rende ad oggi un metodo ripetitivo e sicuro di immediato uso nella pratica clinica per poter estrapolare dati prognostici dalla valutazione citologica.³⁷

Sebbene l'identificazione del grado istologico risulti un passaggio cardine nella valutazione del mastocitoma nel cane, nel corso degli anni la diagnosi istologica si è arricchita anche di markers di proliferazione, come il Ki67 e l'indice mitotico, per meglio caratterizzare la valutazione prognostica del paziente.

Il Ki67 è una proteina nucleare evidenziabile con una specifica colorazione immunostochimica e la cui concentrazione aumenta in presenza di proliferazione cellulare. Sono numerosi gli studi che hanno indagato questo marker e non sempre i risultati sono stati così chiari e definitivi da attribuirgli un forte significato prognostico in termini di sopravvivenza nel mastocitoma canino, seppur in alcuni lavori abbia permesso di differenziare mastocitomi con medesimo grado istologico ma comportamento biologico più aggressivo.²⁰⁻²² A differenza del Ki67, l'indice mitotico non necessita di una valutazione immunostochimica per la sua quantificazione e si è rivelato un fattore prognostico capace di discriminare, a parità di grado istologico (secondo Patnaik e colleghi, 1984), i cani con prognosi peggiore, tanto da essere poi successivamente incluso nella più recente classificazione di Kiupel e colleghi (2011).^{19,38-41} Sono inoltre descritte ulteriori valu-

La ricerca delle metastasi consente di decretare lo stadio clinico del mastocitoma e la prognosi. Lo stadio clinico non è correlato in alcun modo al grado istologico.

tazioni dell'attività proliferativa nei mastocitomi che sono però poco studiate e non disponibili nell'analisi diagnostica routinaria dei laboratori di analisi. Tra queste valutazioni si riportano a titolo informativo la DNA-ploidia, la morfometria nucleare e la densità vascolare intratumorale.⁴²⁻⁴⁴ L'espressione della proteina KIT (CD117) evidenziata con indagini immunostochimiche e la mutazione del correlato gene c-KIT indagabile con analisi PARR (PCR for antigen receptor rearrangements), sono stati oggetto di studi che ne hanno poi decretato il loro ruolo prognostico nei mastocitomi del cane.⁴⁵⁻⁴⁸ Ruolo ul-

teriormente avvalorato dal riscontro della medesima mutazione del mastocitoma primitivo anche nella malattia metastatica linfonodale regionale.⁴⁹ Idealmente, nel corso dei prossimi anni, si potrebbe quindi disporre nella pratica clinica di mastocitomi con distinti profili molecolari⁵⁰ a cui si associano specifici comportamenti biologici, mentre sarà possibile tra non molto disporre di un unico profilo prognostico patologico del mastocitoma basato sulla valutazione istologica del grading, sulla valutazione immunohistochimica del KIT e sulla valutazione genetica del c-KIT così da integrare informazioni diagnostiche e prognostiche spesso ad oggi valutate solo singolarmente.^{19,47}

PROCEDURE DIAGNOSTICHE PER LA RICERCA DELLE METASTASI LOCO-REGIONALI E A DISTANZA

La stadiazione del mastocitoma canino ha già dal 1980 una sua ben precisa classificazione comunicata dalla WHO come per altre neoplasie spontanee del cane, del gatto e dell'uomo (Tabella 2).²³ Il suo significato prognostico è stato rivalutato di recente, soprattutto per il IV stadio.^{6-9,13,18} La classificazione in stadi è stata poco utilizzata nella valutazione prognostica del mastocitoma canino e questo è da imputare prevalentemente al fatto che nel passato la capacità di discriminare citologicamente tra mastociti neoplastici e mastociti reattivi all'interno di organi bersaglio (linfonodo, milza, fegato, sangue, midollo osseo) fosse fortemente dibattuta.⁵¹ Tale controversia risulta ampiamente superata negli ultimi anni grazie alla pubblicazione di ricerche dedicate a questo aspetto.⁶⁻¹¹ Mentre è ampiamente accettato che i pazienti con uno o più fattori prognostici negativi debbano ricevere una valutazione più accurata, è sicuramente oggetto di dibattito se la ricerca estensiva di metastasi debba rivolgersi anche a cani affetti da mastocitoma in assenza di fattori prognostici clinici e patologici che suggeriscano una prognosi negativa.² In quest'ultimi la scelta di includerli in un processo stadiativo estensivo deve essere valutata dal clinico, caso per caso, confrontandosi con il relativo proprietario (Figura 9). Tuttavia due recenti ricerche suggeriscono in modo inequivocabile come non sia corretto non eseguire una ricerca di metastasi a distanza in base al solo grading istologico (in particolare se di basso grado) oppure alla sola assenza clinica di linfadenomegalia regionale o sulla base della negatività citologica del prelievo linfonodale.^{11,12}

Recentemente sono state pubblicate delle linee guida sul mastocitoma canino che, alla luce di precedenti ricerche, hanno sottolineato il ruolo prognostico negativo delle metastasi linfonodali confermate con la citologia, suggerendo una maggiore attenzione ed una rivalutazione del ruolo prognostico degli stadi clinici I-II-III proposti

dalla WHO.^{2,10,14,24,32,33} La ricerca di metastasi al linfonodo regionale è oggi uno degli argomenti più discussi dalla comunità scientifica internazionale, non solo per il mastocitoma, ma per molti altri tumori maligni del cane e del gatto. Il campionamento del linfonodo regionale deve essere sempre eseguito soprattutto quando la stazione linfonodale drenante la regione anatomica in cui si è sviluppato il mastocitoma primitivo è conosciuta. Sicuramente il prelievo citologico linfonodale nella fase stadiativa pretrattamento e nel follow-up post-trattamento è sempre suggerito (soprattutto nei mastocitomi muco-cutanei e viscerali), sia se eseguito a mano libera per i linfonodi palpabili, sia per via eco-guidata per quelli considerati clinicamente “no palpable”. Tuttavia è doveroso ricordare che con una citologia linfonodale negativa per metastasi, la rimozione chirurgica del linfonodo e il relativo esame istologico garantisce una maggiore sensibilità nella valutazione della presenza/assenza della malattia metastatica regionale.¹¹ La linfadenectomia regionale dovrebbe pertanto essere eseguita sempre, anche in presenza di linfonodi di piccole dimensioni. In questo specifico contesto la linfadenectomia regionale assume un ruolo stadiativo centrale che potrà consentire, ove presente, la diagnosi precoce di metastasi linfonodali e il trattamento con terapie adiuvanti altrimenti erroneamente non suggerite. In assenza di una stazione linfonodale anatomicamente riconosciuta e rintracciabile mediante palpazione possono venire in aiuto la diagnostica per immagini (ecografia con mezzo di contrasto/scintigrafia) o l'utilizzo di coloranti vitali.⁵²⁻⁵⁴

La diagnosi certa di metastasi al linfonodo regionale modifica il piano terapeutico e peggiora la prognosi.

In letteratura sono stati utilizzati diversi criteri che hanno permesso di decretare la positività citologica del linfonodo: cluster di mastociti, aumento del numero di mastociti in più di 2HPF, la presenza di mastociti in numero elevato oppure di mastociti poco differenziati.^{14,26,33} In uno studio retrospettivo del 2009 di Krick e colleghi veniva proposta una classificazione citologica delle metastasi linfonodali in 5 categorie (Tabella 3) e dai risultati si evince come effettivamente la sopravvivenza in cani i cui linfonodi venivano classificati con diagnosi citologica certa e probabile di metastasi da mastocitoma fosse inferiore rispetto ai non metastatici, mentre rimane ancora in dubbio la prognosi per quei cani in cui i linfonodi venivano diagnosticati come “possibile metastasi” ed in cui i tempi di sopravvivenza non differivano dai non metastatici.¹⁰ Gli autori riportano come il numero esiguo di campioni all'interno delle singole categorie potrebbe giustificare l'assenza di

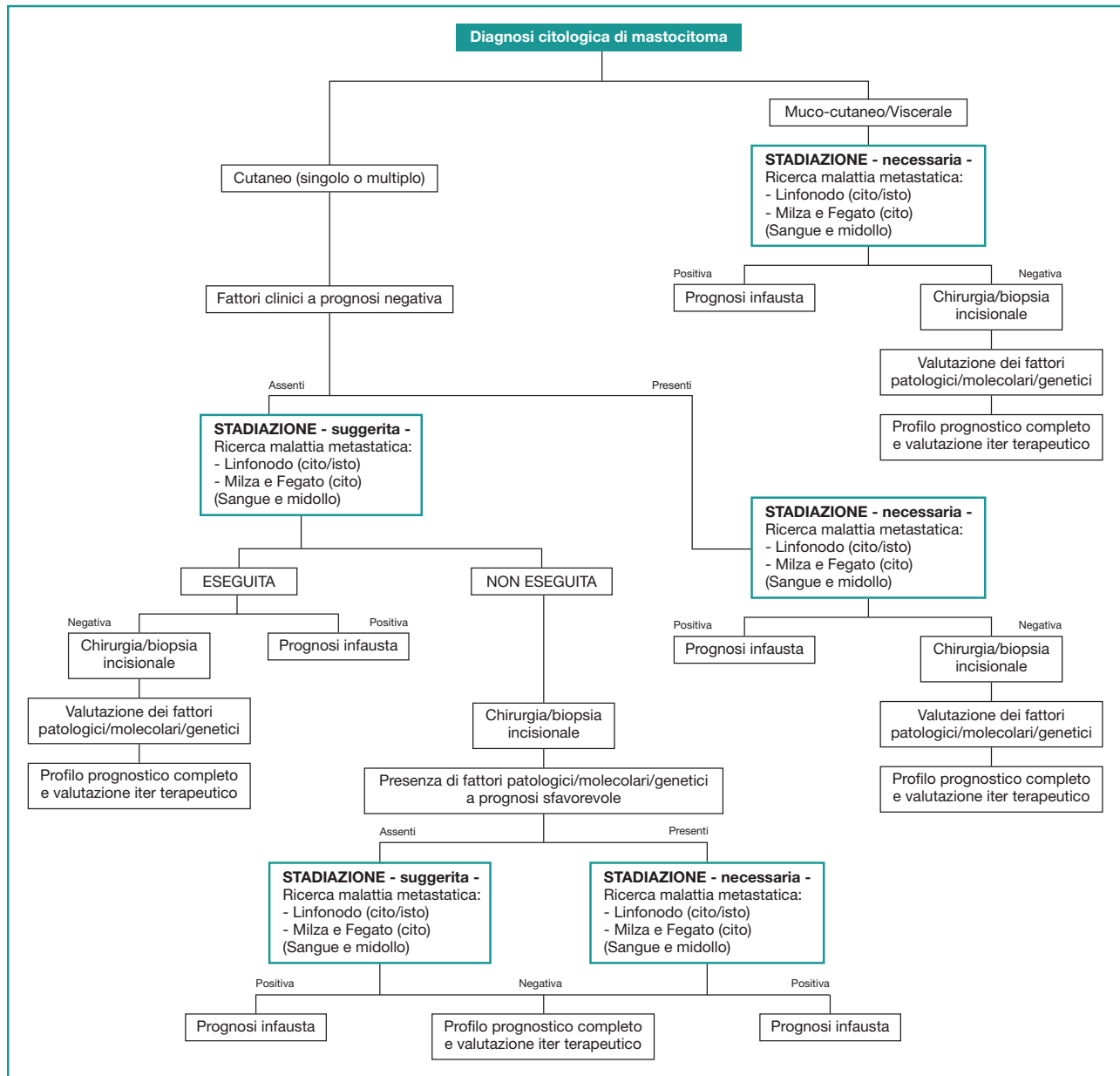


Figura 9 - Algoritmo decisionale per il processo stadiativo del mastocitoma del cane.

Tabella 3 - Valutazione citologica del campionamento linfonodale secondo Krick et al, 2011 ¹⁰	
Diagnosi citologica	Descrizione
Linfonodo normale	Assenza di mastociti
Linfonodo reattivo	Più del 50% di piccoli linfociti frammentati a prolinfociti, linfoblasti, plasmacellule e/o da basso a moderato numero di macrofagi, eosinofili, neutrofili e/o rari ed isolati mastociti
Possibile metastasi	Almeno su un vetrino, due o tre aggregati formati da 2-3 mastociti
Probabile metastasi	Almeno su un vetrino, più di tre aggregati formati da 2-3 mastociti e/o da due a cinque aggregati formati da più di 3 mastociti
Metastasi certa	Almeno su un vetrino, tessuto linfoide assente in presenza di mastociti e/o presenza di aggregati di mastociti poco differenziati con pleomorfismo, anisocitosi, anisocariosi e/o mastociti con poca granulazione citoplasmatica e/o più di cinque aggregati formati da più di 3 mastociti

Tabella 4 - Valutazione istologica in seguito a linfadenectomia secondo Weishaar et al, 2014¹¹

Classificazione	Descrizione
HN0 – Non metastatico	Nessuno o rari (0-3) mastociti isolati localizzati a livello dei seni (subcapsulari, paracorticali, medullari) e/o del parenchima (0-3 mastociti/campo a 400x ingrandimento), o il campione non corrisponde alle descrizioni successive.
HN1 – Pre-metastatico	Più di tre mastociti isolati localizzati a livello dei seni (subcapsulari, paracorticali, medullari) e/o del parenchima in almeno 4 campi ad ingrandimento 400X.
HN2 – Metastasi precoce	Cluster di almeno 3 mastociti localizzati a livello dei seni (subcapsulari, paracorticali, medullari) e/o del parenchima, o distese di mastociti nei seni sinusoidali.
HN3 – Metastasi conclamata	Distruzione della normale architettura del linfonodo per la presenza di foci, noduli o masse conclamate di mastociti.

una differenza statisticamente significativa tra i due tempi di sopravvivenza dei rispettivi gruppi. Se la diagnosi citologica di metastasi si è rivelata un ottimo metodo di staging per il mastocitoma, un recente lavoro ha proposto un'ulteriore classificazione delle metastasi da mastocitomi nei linfonodi regionali sulla base, questa volta, di indagini istologiche (normale; pre-metastatica; inizialmente metastatica; metastasi certa) successiva a linfadenectomia (Tabella 4).¹¹ Nello studio si identifica, pur trattandosi di un lavoro retrospettivo e basato su una popolazione di animali sottoposta a un trattamento chemioterapico non omogeneo, una correlazione prognostica che vede associare alle categorie “metastasi precoce” e “metastasi certa” tempi di sopravvivenza inferiori rispetto alle categorie “pre-metastatici” e “normali”.¹¹

La ricerca di metastasi a distanza nel mastocitoma canino e più precisamente la diagnosi del IV stadio della WHO²³ (Tabella 2) è stata sicuramente poco documentata in letteratura. La carenza di informazioni su questo specifico argomento è il risultato di una serie di aspetti che non vanno trascurati. Il principale è stato sicuramente la scarsa chiarezza e definizione di come identificare citologicamente la presenza di metastasi negli organi bersaglio, in particolare in milza e fegato. Storicamente la diagnosi citologica di metastasi si rifaceva al modello presenza/assenza di mastociti, cellule ubiquitarie in questi organi, senza entrare nel merito di precise caratteristiche citologiche.⁵¹ Diverse ricerche hanno risposto e chiarito in modo puntuale una serie di perplessità che nel passato avevano incentivato l'oncologo a non stadiare i cani con mastocitomi. In particolare i lavori di Marconato e colleghi (2008) e di Stefanello e colleghi (2009) forniscono precise indicazioni sulla diagnosi citologica di metastasi, mentre lo studio di Book e colleghi (2011) chiarisce e sottolinea la necessità di campionare milza e fegato anche in assenza di alterazioni ecografiche evidenti.^{6,8,9} In aggiunta, un recente studio evidenzia come il grading istologico, sia con il sistema di Patnaik e colleghi (1984) che di Kiu-



Video 1 - Prelievo citologico ecoguidato per agoinfissione (22 gauge) del parenchima splenico. Sul riquadro superiore sinistro dello schermo è possibile riconoscere il movimento dell'ago nel parenchima splenico. <http://cms.scivac.it/it/v/12200/1>



Video 2 - Prelievo citologico ecoguidato per agoaspirazione (22 gauge) del parenchima epatico. Sul riquadro superiore sinistro dello schermo è possibile riconoscere il movimento dell'ago nel parenchima epatico. <http://cms.scivac.it/it/v/12200/2>

pel e colleghi (2011), sia da solo non capace di predire l'evoluzione metastatica e che per una corretta valutazione prognostica sia necessario avvalersi anche della stadiazione clinica.¹² Oggi è accettato che la stadiazione del mastocitoma canino per l'esclusione del IV stadio debba prevedere un'ecografia addominale con prelievi citologici ecoguidati di milza (prelievo per agoinfissione, Video 1) e di fegato (prelievo per agoaspirazione, Video 2) che possono a seconda dell'indole del cane essere eseguiti con paziente vigile, sedato o in narcosi.^{8,9}

Lo stadio IV ha sempre prognosi infausta. Per il suo inquadramento sono necessari prelievi citologici di milza e fegato. Si possono associare citologia di sangue periferico e midollo osseo.

Tali prelievi si sono rivelati sicuri e non necessitano per la loro esecuzione della valutazione dei parametri coagulativi (a meno che il paziente non sia affetto da patologie concomitanti che richiedano approfondimenti diagnostici).^{8,9} La valutazione citologica di questi prelievi si rifà ad una classificazione (Tabella 5) dove si sottolinea che la sola presenza di mastociti negli organi bersaglio non è sufficiente a decretare la diagnosi di metastasi (Figura 10). Qualora invece la diagnosi citolo-

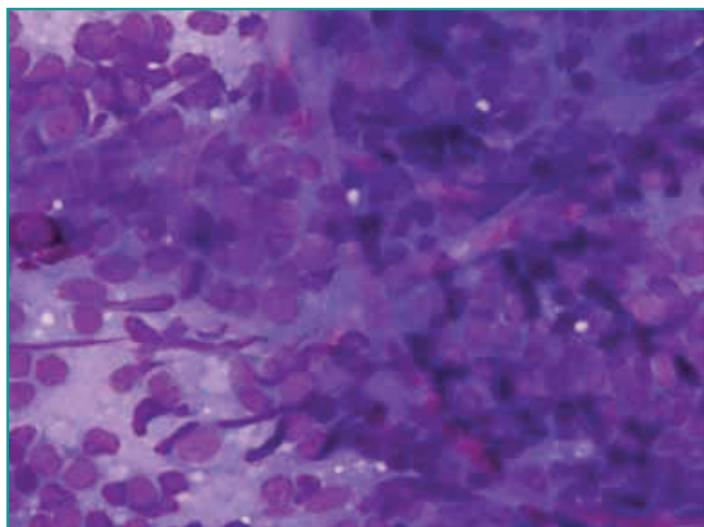


Figura 10 - Prelievo citologico tramite ago-infissione da parenchima splenico: accanto a cellule linfoidi si osservano capillari cui è associato un mastocita contenente numerosi granuli citoplasmatici. Il campione è negativo per metastasi da mastocitoma. Colorazione del vetrino: May-Grünwald Giemsa - Medio ingrandimento.

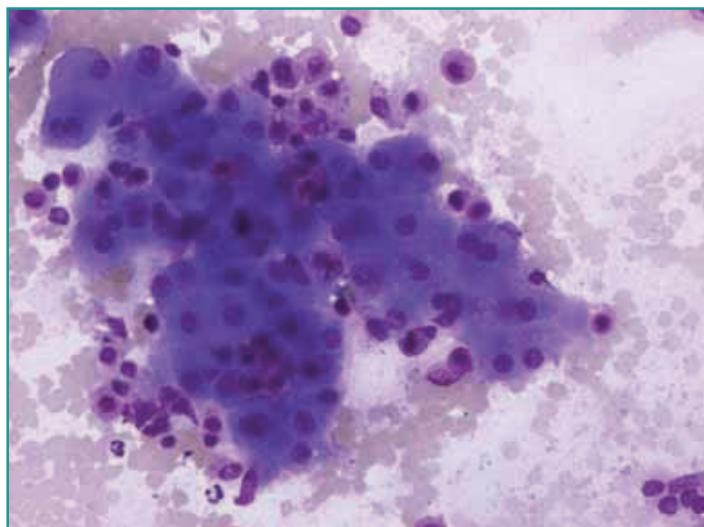


Figura 11 - Prelievo citologico tramite ago-aspirazione da parenchima epatico: accanto a un gruppo di epatociti è presente un buon numero di mastociti suggestivi di metastasi da mastocitoma. Colorazione del vetrino: May-Grünwald Giemsa - Piccolo ingrandimento.

gica di coinvolgimento epatico e splenico fosse confermata, essa si associa a ridotti tempi di sopravvivenza (Figura 11).^{8,9}

La valutazione del sangue periferico e del midollo osseo nella stadiazione del mastocitoma hanno sempre avuto un ruolo marginale. Da un punto di vista esclusivamente prognostico, se è già stata diagnosticata una positività a milza e/o fegato, la positività del sangue periferico e/o del midollo osseo non modificano lo stadio del mastocitoma (Tabella 2). Storicamente si suggeriva la valutazione di uno striscio del *buffy coat* per valutare la presenza di mastociti circolanti⁹ ma attualmente il beneficio di tale procedura non è confermato, tanto che vengono descritte altre patologie non neoplastiche che possono creare un aumento dei mastociti circolanti e che quindi possono confonderne la valutazione.⁵⁶ Sulla scorta della prognosi infausta associata all'invasione di milza e fegato e la bassa incidenza della sua infiltrazione, il prelievo di midollo osseo viene generalmente evitato; tuttavia può rientrare nel percorso di stadiazione di quei pazienti in cui si pianifica una terapia complessa e costosa. In un lavoro del 2007 solo il 2.8% dei pazienti affetti da mastocitoma cutaneo presentava invasione del midollo osseo.⁵⁷ In un altro studio la positività del midollo in 14 pazienti affetti da mastocitoma di grado istologico II e III risultava essere del 21%.⁵⁸ Alla luce della sola inclusione di mastocitomi ad alto grado questa percentuale è probabilmente una sovrastima se considerata tutta la popolazione canina affetta da mastocitoma (includendo quindi anche mastocitomi di basso grado che tendono ad avere un tasso di metastasi a distanza inferiore). Lo stesso articolo sottolineava inoltre come in uno di questi casi il prelievo di midollo osseo fosse risultato positivo solo in una delle due sedi campionate. Questo potrebbe indurre a pensare che sia necessario prelevare campioni da sedi diverse per escludere con certezza la malattia metastatica a tale tessuto ma tenuto conto dell'esiguità del campione tale dato dovrebbe essere confermato su una popolazione più ampia.⁵⁸ Si ricorda inoltre che non esistono linee guida per l'identificazione di positività del midollo osseo; nello studio più recente si considera positivo se la conta cellulare evidenzia più di un 10% di mastociti o qualora atipici, più del 5%.⁶

Tabella 5 - Criteri di diagnosi citologica per malattia metastatica a carico di milza e fegato secondo Stefanello et al, 2009⁸

Organo negativo per metastasi	Non si evidenziano mastociti
	Mastociti rari ed isolati
	Mastociti associati al connettivo
Organo positivo per metastasi	Cluster di mastociti ben differenziati
	Mastociti ben differenziati in numero elevato
	Mastociti morfologicamente atipici

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Prof. Mario Caniatti (Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica - Università degli Studi di Milano) per le immagini citologiche e il Prof. Stefano Faverzani (Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare) per i video relativi ai campionamenti citologici ecoguidati di milza e fegato.

PUNTI CHIAVE

- Il grado istologico (metodo secondo Patnaik e colleghi, 1984 e/o Kiupel e colleghi, 2011) non è sufficiente ad identificare il mastocitoma cutaneo canino con metastasi al linfonodo regionale e/o a distanza.
- Il mastocitoma di IV stadio della WHO si associa sempre a prognosi sfavorevole. Per la sua diagnosi è necessario eseguire ecografia addominale con citologia di milza e fegato, citologia su sangue periferico e/o midollo osseo.
- La diagnosi certa di metastasi al linfonodo regionale deve avvalersi quando possibile dell'esame istologico su linfonodo escisso chirurgicamente in toto.
- Le variabili cliniche, patologiche, molecolari e genetiche predittive di un comportamento più aggressivo indirizzano il clinico nel proporre il processo stadiativo ma non consentono in alcun modo di diagnosticare/escludere la presenza di metastasi.

Canine mast cell tumor clinical staging: a complete patient assessment

The confirmed diagnosis of mast cell tumour in dogs and the identification of clinical, pathological and molecular variables with prognostic value on metastatic spread help veterinarians in the decision to sample possible metastatic site such as regional lymph nodes, liver, spleen, peripheral blood and bone marrow. The presence of loco-regional and/or distant metastasis decreases the survival time. An early detection of loco-regional and/or distant metastatic disease allows to decide the most correct and efficacious treatment protocol and also to better explain therapeutic options and prognosis to the owner.

BIBLIOGRAFIA

1. London CA, Thamm DH, Vail DM. Mast cell tumor. In: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5th edn., Withrow SJ and Vail DM, eds., St.Louis, Saunders- Elsevier, 2013, pp. 335-355.
2. Blackwood L, Murphy S, Buracco P, *et al.* European Consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology* 10:e1-e29, 2012.
3. London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, *et al.* Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumour following surgical excision. *Clinical Cancer Research* 15: 3856-3865, 2009.
4. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, *et al.* Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22: 1301-1309, 2008.
5. Patnaik AK, Ehler WJ and MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumour: Morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology* 21: 469-474, 1984.
6. Marconato L, Bettini G, Giacoboni C, *et al.* Clinicopathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22: 1001-1007, 2008.
7. Marconato L, Marchetti V, Francione D, *et al.* Morphometrical approach for predicting regional lymph nodemicrometastatic load in canine mast cell tumours: preliminary results. *Veterinary and Comparative Oncology* 6:162-170, 2008.
8. Stefanello D, Valenti P, Favazzani S, *et al.* Ultrasound-guided cytology of spleen and liver: a prognostic tool in canine cutaneous mast cell tumor. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:1051-1057, 2009.
9. Book AP, Fidel J, Wills T, *et al.* Correlation of ultrasound findings, liver and spleen cytology, and prognosis in the clinical staging of high metastatic risk canine mast cell tumors. *Veterinary and Radiology Ultrasound* 52:548-554, 2011.
10. Krick EL, Billings AP, Shofer FS, *et al.* Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. *Veterinary and Comparative Oncology* 7: 130-138, 2009.
11. Weishaar KM, Thamm DH, Worley DR, *et al.* 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. *Journal of Comparative Pathology* 151:329-338, 2014.
12. Stefanello D, Buracco P, Sabbatini S, *et al.* 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). *Journal of American Veterinary Medical Association* 246:765-769, 2015.
13. Miller RL, Van Lelyveld S, Warland J, *et al.* A retrospective review of treatment and response of high-risk mast cell tumours in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2014. doi: 10.1111/vco.12116.
14. Thamm DH, Turek MM and Vail DM. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *The Journal of Veterinary Medical Science* 68: 581-587, 2006.
15. Mullins MN, Dernel WS, Withrow SJ *et al.* Evaluation of prognostic factors associated with multiple cutaneous mast cell tumours treated with surgery with or without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 228:91-95, 2006.
16. Turrel JM, Kitchell BE, Miller LM, *et al.* Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193: 936-940, 1988.
17. Ginn PE, Fox LE, Brower JC, *et al.* Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 37:33-39, 2000.
18. Warland J, Amores-Fuster I, Newbury W *et al.* The utility of staging in canine mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 12:287-298, 2014.
19. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, *et al.* Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behaviour. *Veterinary Pathology* 48: 147-155, 2011.
20. Maglennon GA, Murphy S, Adams V, *et al.* Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 6:268-274, 2008.

21. van Lelyveld S, Warland J, *et al.* Comparison between Ki-67 index and mitotic index for predicting outcome in canine mast cell tumours. *Journal of Small Animal Practice* 56:312-319, 2015.
22. Berlato D, Murphy S, Monti P, *et al.* Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 13: 143-150, 2015.
23. Owen LN. TNM Classification of Tumors in Domestic Animal, 1st ed. Geneva: World Health Organization; 1980.
24. Murphy S, Sparkes AH, Blunden AS, *et al.* Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Record* 158: 287-291, 2006.
25. O'Connell K, Thomson M. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. *Veterinary and Comparative Oncology* 11:51-62, 2013.
26. Gieger TL, Théon AP, Werner JA, *et al.* Biologic behavior and prognostic factors for mast cell tumors of the canine muzzle: 24 cases (1990-2001). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17: 687-692, 2003.
27. Takahashi T, Kadpsawa T, Nagase M *et al.* Visceral mast cell tumours in dogs: 10 cases (1982-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 216:222-226, 2000.
28. Bahrami AM, Khaki F, Zehtabian S, *et al.* Uterine mast cell tumor: a clinical and cytohistopathological study. *Journal of Ovarian Research* 7:105, 2014.
29. Jacobs T, Hoppe B and Moore F. Visceral mast cell tumour in a dog with haemabdomen and mastocytæmia. *Journal of Small Animal Practice* 48:180, 2007.
30. Baldi A, Colloca E and Spugnini EP. Lomustine for the treatment of gastrointestinal mast cell tumour in a dog. *Journal of Small Animal Practice* 47:465-467, 2006.
31. Stefanello D, Morello E, Roccabianca P, *et al.* Marginal excision of low-grade spindle cell sarcoma of canine extremities: 35 dogs (1996-2006). *Veterinary Surgery* 37:461-465, 2008.
32. Hume CT, Kiupel M, Rigatti L, *et al.* Outcomes of dog with grade 3 mast cell tumors: 43 cases (1997-2007). *Journal of American Animal Hospital Association* 47:37-44, 2011.
33. Cahalane AK, Payne S, Barber LG, *et al.* Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). *Journal of American Veterinary Medical Association* 225:401-408, 2004.
34. Welle MM, Rohrer Bley C, Howard J, *et al.* Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology* 19: 321-339, 2008.
35. Northrup NC, Harmon BG, Gieger TL, *et al.* Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17: 561-564, 2005.
36. Sabattini S, Scarpa F, Berlato D, *et al.* Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3? *Veterinary Pathology* 52:70-73, 2015.
37. Scarpa F, Sabattini S and Bettini G. Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2014. doi: 10.1111/vco.12090.
38. Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, *et al.* Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 44:335-341, 2007.
39. Elston L, Sueiro FA, Cavalcanti J, *et al.* The importance of the mitotic index as a prognostic factor for canine cutaneous mast cell tumors - a validation study. *Veterinary Pathology* 46:362-365, 2009.
40. Preziosi R, Sarli G, and Paltrinieri M. Multivariate survival analysis of histological parameters and clinical presentation in canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Research and Communication* 31:287-296, 2007.
41. Thompson JJ, Pearl DL, Yager JA, *et al.* Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. *Veterinary Pathology* 48:156-168, 2011.
42. Ayl RD, Couto CG, Hammer AS, *et al.* Correlation of DNA ploidy to tumor histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 29:386-390, 1992.
43. Patruno R, Arpaia N, Gadaleta CD, *et al.* VEGF concentration from plasma-activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13:555-561, 2009.
44. Strefezzi Rde F, Xavier JG, Kleeb SR, *et al.* Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation* 21:821-825, 2009.
45. Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB, *et al.* The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 41, 371-377, 2004.
46. Preziosi R, Morini M and Sarli G. Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16, 554-561, 2004.
47. Gil da Costa RM, Matos E, Rema A, *et al.* CD117 immunorexpression in canine mast cell tumours, correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Veterinary Research* 3:19, 2007.
48. Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, *et al.* Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours, a retrospective cohort study. *The Veterinary Journal* 196, 492-498, 2013.
49. Marconato L, Zorzan E, Giantin M, *et al.* Concordance of c-kit mutational status in matched primary and metastatic cutaneous canine mast cell tumors at baseline. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:547-553, 2014.
50. Giantin M, Granato A, Baratto C, *et al.* Global gene expression analysis of canine cutaneous mast cell tumor: could molecular profiling be useful for subtype classification and prognostication? *PLoS One* 9:e95481, 2014.
51. Finora K, Leibman NF, Fettman MJ, *et al.* Cytological comparison of fine-needle aspirates of liver and spleen of normal dogs and of dogs with cutaneous mast cell tumours and an ultrasonographically normal appearing liver and spleen. *Veterinary and Comparative Oncology* 4:178-183, 2006.
52. Wells S, Bennett A, Walsh P, *et al.* Clinical usefulness of intradermal fluorescein and patent blue violet dyes for sentinel lymph node identification in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology* 4: 114-122, 2006.
53. Worley DR. Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. *Veterinary and Comparative Oncology* 12:215-226, 2014.
54. Gelb HR, Freeman LJ, Rohleder JJ, *et al.* Feasibility of contrast-enhanced ultrasound-guided biopsy of sentinel lymph nodes in dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 51:628-633, 2010.
55. Lurie DM, Seguin B, Schneider PD, *et al.* Contrast-assisted ultrasound for sentinel lymph node detection in spontaneously arising canine head and neck tumors. *Investigative Radiology* 41:415-421, 2006.
56. McManus PM. Frequency and severity of mastocytæmia in dogs with and without mast cell tumours: 120 cases (1995-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 15: 355-357, 1992.
57. Endicott MM, Charney SC, McKnight JA, *et al.* Clinicopathological findings and results of bone marrow aspiration in dogs with cutaneous mast cell tumours: 157 cases (1999-2002). *Veterinary and Comparative Oncology* 5:31-37, 2007.
58. Aubry OA, Spangler EA, Scheils SE, *et al.* Evaluation of bone marrow aspirates from multiple sites for staging of canine lymphoma and mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 12: 58-66, 2014.