

Linee guida SIONCOV 2025 per l'approccio al cane con emangiosarcoma splenico



L'evoluzione rapida delle conoscenze scientifiche nel campo dell'oncologia veterinaria, supportata da una vasta produzione letteraria, e la necessità di allinearsi agli standard internazionali della ricerca nel campo dell'oncologia veterinaria e alle norme di Buona Pratica Clinica rendono fondamentale la formulazione di linee guida aggiornate, di facile consultazione e basate sulle migliori evidenze scientifiche disponibili. In quest'ottica, un panel di esperti ha redatto e sottoposto a revisione esterna le presenti linee guida, che delineano l'approccio al cane con emangiosarcoma splenico. Il documento non ha carattere permanente, ma riflette le conoscenze mediche attuali e deve sempre essere adattato al paziente e al contesto clinico in cui si interviene.

Laura Marconato*, Med Vet, DECVIM-CA (Oncology)

Riccardo Finotello
Med Vet, PhD, FHEA, DECVIM-CA (Oncology), FRCVS

Maurizio Annoni, Med Vet

Marina Aralla, Med Vet, PhD, GPCert (Onco)

Marina Martano, Med Vet, PhD

Giulia Mangiagalli, Med Vet, DECVCP

Marco Rondena, Med Vet, DECVCP

Maria Amati, Med Vet, Master oncologia secondo livello

Federica Rossi, Med Vet, SRV, DECVDI

GRUPPO DI LAVORO

L'evoluzione rapida delle conoscenze scientifiche nel campo dell'oncologia veterinaria, supportata da una vasta produzione letteraria, e la necessità di allinearsi agli standard internazionali della ricerca nel campo dell'oncologia veterinaria e alle norme di Buona Pratica Clinica rendono fondamentale la formulazione di linee guida sulla gestione dell'emangiosarcoma splenico del cane. Il 10 e 11 febbraio 2024 il Consiglio Direttivo e i membri della Società Italiana di Oncologia Veterinaria (SIONCOV) si sono riuniti in una tavola rotonda per definire, sulla base della revisione critica delle evidenze scientifiche attualmente disponibili, linee guida che dettino i passi necessari per diagnosticare, stadiare e trattare l'emangiosarcoma splenico del cane, sintetizzando ciò che è attual-

mente conosciuto e affrontando le incertezze con comportamenti di buona pratica clinica. Alla tavola rotonda hanno partecipato alcuni specialisti EBVS® ed esperti, e altri sono stati invitati successivamente, individuati tra quanti hanno dato un contributo significativo alla letteratura internazionale. Si è così istituito un panel con competenze trasversali e multidisciplinari, che ha integrato i diversi approcci diagnostici e terapeutici. I membri del panel hanno presentato la sintesi delle prove raccolte nella letteratura scientifica senza limiti temporali, per poi lasciare ai membri della SIONCOV la possibilità di discuterne. Una volta raccolte e valutate le evidenze, i membri del panel hanno provveduto a una prima stesura delle linee guida e delle raccomandazioni. Qualora la letteratura fosse assente, il panel ha espresso la

*Corresponding author: laura.marconato@unibo.it

Ricevuto: 09/07/2025 - Accettato: 29/09/2025

propria opinione. Le raccomandazioni sono state infine votate da tutti i membri del panel. Se autori di uno o più lavori considerati per la raccomandazione, i membri del panel si sono astenuti dalla votazione relativa alla forza della raccomandazione, indicando espressamente nelle tabelle riassuntive il potenziale conflitto di interesse per ciascuna raccomandazione. Il documento è stato sottoposto a revisori esterni indipendenti per eventuali commenti.

Le raccomandazioni contenute in questo documento sono presentate in forma sintetica e schematica per renderne facile la consultazione; esse riflettono le migliori evidenze scientifiche disponibili; devono tuttavia sempre essere adattate al contesto clinico in cui si interviene e al paziente, non intendendo sostituirsi alla valutazione e alla responsabilità del medico veterinario di fronte al caso specifico. Il presente documento si propone come strumento di lavoro attuativo e di supporto per fornire raccomandazioni basate sull'evidenza per la gestione dell'emangiosarcoma splenico del cane. Destinatari delle linee guida sono tutti i professionisti veterinari, non ristretti al solo ambito oncologico, per assisterli nelle decisioni sulla gestione appropriata del paziente.

GRUPPO DI LAVORO

Coordinatore:

Laura Marconato - Oncologia Medica - Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia

Panel (ordine alfabetico):

Maria Amati - Oncologia Medica - Clinica Veterinaria Oltrepò - Stradella (PV), Italia e Ospedale Veterinario Città di Pavia - Animalia, Pavia (PV), Italia

Maurizio Annoni - Chirurgia Oncologica - AniCura Clinica Veterinaria Tibaldi, Milano (MI), Italia

Marina Aralla - Oncologia Medica - Pronto Soccorso Veterinario Laudense, Lodi (LO), Italia

Riccardo Finotello - Oncologia Medica - AniCura Ospedale Veterinario i Portoni Rossi, Zola Predosa (BO), Italia

Giulia Mangiagalli - Patologia Clinica - Clinica Veterinaria Gran Sasso, Milano (MI), Italia e MYLAV Laboratorio Analisi Veterinarie, Rho (MI), Italia

Laura Marconato - Oncologia Medica - Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia

Marina Martano - Chirurgia Oncologica - Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma, Parma, Italia

Marco Rondena - Istopatologia - Clinica Veterinaria Privata e Laboratorio San Marco, Veggiano (PD), Italia

Federica Rossi - Diagnostica per Immagini - AniCura Clinica Veterinaria dell'Orologio, Sasso Marconi (BO), Italia

Panel Esterno (ordine alfabetico):

Walter Bertazzolo - Patologia Clinica - MYLAV Laboratorio Analisi Veterinarie, Rho (MI), Italia

Antonella Borgatti - Oncologia Medica - University of Minnesota College of Veterinary Medicine, St. Paul, MN, Stati Uniti

Dario Drudi - Chirurgia - DocVet - Clinica Veterinaria Nervianese, Nerviano (MI), Italia

Mirko Mattolini - Diagnostica per Immagini - AniCura Clinica Veterinaria dell'Orologio, Sasso Marconi (BO), Italia

Silvia Sabattini - Anatomia Patologica - Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia

Come Leggere le Raccomandazioni

Le raccomandazioni esprimono l'importanza clinica di una procedura. Sono presentate in tabelle e vengono corredate dalla certezza delle prove a supporto e dalla forza della raccomandazione.

La valutazione della certezza delle prove è graduata su quattro livelli:

- 1) **molto bassa (opinione espressa dal panel)**, quando si basa sull'opinione degli esperti, indicazioni di comitati o libri di testo;
- 2) **bassa**, quando si basa sulle conclusioni di studi descrittivi non analitici (case reports, serie di casi);
- 3) **moderata**, quando si basa sulle conclusioni di studi descrittivi analitici (studi caso-controllo, studi di coorte, studi trasversali);
- 4) **alta**, quando si basa sulle conclusioni di trial clinici randomizzati o revisioni sistematiche con o senza metanalisi.

La forza della raccomandazione viene graduata su quattro livelli in base all'importanza:

- 1) **forte a favore**, quando l'intervento o il consiglio procedurale in esame **dovrebbero** essere considerati come prima opzione (evidenza che i benefici sono prevalenti sui danni);
- 2) **condizionata a favore**, quando l'intervento o il consiglio procedurale in esame **possono** essere considerati come opzione di prima intenzione, consapevoli dell'esistenza di alternative ugualmente proponibili (incertezza riguardo alla prevalenza dei benefici sui danni);
- 3) **condizionata a sfavore**, quando l'intervento o il consiglio procedurale in esame **non dovrebbero** essere considerati come opzione di prima intenzione; essi potrebbero comunque essere suscettibili di impiego in casi altamente selezionati (incertezza riguardo alla prevalenza dei danni sui benefici);
- 4) **forte a sfavore**, quando l'intervento o il consiglio procedurale in esame **non devono** essere in alcun caso

presi in considerazione (evidenza che i danni sono prevalenti sui benefici).

Le raccomandazioni cliniche, basate su una valutazione critica e sistematica delle evidenze disponibili, forniscono un bilancio tra benefici e potenziali effetti avversi delle diverse opzioni terapeutiche, costituendo così il punto di riferimento più importante per i medici veterinari, uno standard di qualità dell'assistenza e uno strumento essenziale per prendere decisioni sanitarie. Si sottolinea che la valutazione della certezza delle evidenze non riflette sempre l'importanza clinica delle raccomandazioni. Pertanto, la forza delle raccomandazioni non rispecchia solo la qualità metodologica delle prove disponibili. Ci possono essere casi in cui anche in presenza di una prova di efficacia *moderata/alta*, la raccomandazione non è *forte a favore*, qualora esista, a esempio, una reale incertezza su fattibilità e impatto della procedura.

EZIOPATOGENESI

Nonostante l'emangiosarcoma sia un tumore molto frequente nella specie canina, con un'incidenza stimata di 25-100 volte superiore rispetto all'angiosarcoma umano, e circa 50.000 nuovi casi siano diagnosticati ogni anno negli Stati Uniti, la sua eziologia non è stata ancora completamente compresa.

Inizialmente descritto in Europa alla fine degli anni '50 come un tumore tipico del Pastore tedesco, negli anni successivi molte altre razze sono state aggiunte alla lista. La elevata predisposizione in Golden retriever, Pastore tedesco, Boxer, Labrador retriever e Schnauzer nano rimane un dato costante nella letteratura, suggerendo che i tratti ereditari contribuiscano allo sviluppo dell'emangiosarcoma viscerale.¹⁻⁸ Tuttavia, va tenuto presente che la frequenza con cui alcune razze compaiono in letteratura potrebbe essere influenzata dalla loro popolarità, con il rischio di distorcere la reale incidenza della patologia nelle diverse razze. Inoltre, sebbene i tratti ereditari siano importanti nel modulare il rischio, non sono l'unico fattore responsabile dell'emangiosarcoma, e sicuramente la malattia non viene trasmessa in modo diretto da una generazione all'altra. Si tratta piuttosto del risultato di un accumulo di eventi sfavorevoli che si verificano nell'arco della vita di un cane. Pertanto, l'emangiosarcoma non deve essere considerato come un tumore esclusivo di una o poche razze specifiche, ma come una neoplasia in grado di colpire i cani in generale, prevalentemente adulti o anziani, di qualsiasi taglia o razza.

Altri fattori possono contribuire allo sviluppo dell'emangiosarcoma. Ad esempio, l'emangiosarcoma dermico sembra essere direttamente causato dall'esposizione ai raggi UV, in particolare nei cani con mantello chiaro come Pitbull terrier, Boxer e Dalmata, con tendenza a originare in aree glabre o con pelo rado.⁹⁻¹¹ Al contra-

rio, la forma viscerale non sembra essere associata a fattori ambientali. Inoltre, non esistono prove definitive circa un'origine infettiva per l'emangiosarcoma, ma sono state segnalate possibili associazioni con Leishmaniosi e *Bartonella spp.*^{12,13} Tuttavia, questi dati provengono da studi limitati e non permettono di stabilire un rapporto di causalità.

Alcune ricerche hanno identificato un'associazione tra la gonadectomia e un aumentato rischio di sviluppare l'emangiosarcoma a sede splenica e cardiaca. È stato riportato che le femmine sterilizzate hanno un rischio 5 volte maggiore rispetto alle femmine intere di sviluppare un emangiosarcoma cardiaco e un rischio 2,2 volte maggiore per l'emangiosarcoma splenico.^{14,15} Anche uno studio condotto in Italia suggerisce che i cani sottoposti a gonadectomia presentino un rischio maggiore di sviluppare emangiosarcoma, a prescindere dalla razza.⁵ Tuttavia, una ricerca condotta su cani meticci non ha riscontrato un aumento significativo dell'incidenza di emangiosarcoma nei soggetti gonadectomizzati rispetto ai cani interi, indipendentemente dalla categoria di peso.⁵⁰

Successivamente, sono stati condotti studi focalizzati su specifiche razze. In particolare, uno studio retrospettivo ha evidenziato che nelle femmine di Golden retriever sterilizzate in età avanzata (>12 mesi) l'incidenza di emangiosarcoma era 4 volte maggiore rispetto alle femmine intere o sterilizzate precocemente (<12 mesi).¹⁶ Un'analisi basata su questionari condotta sui Vizsla ha rilevato risultati simili: le femmine sterilizzate prima o dopo l'anno di età presentavano un rischio di sviluppare emangiosarcoma, rispettivamente, 6 volte e 11,5 volte maggiore rispetto alle femmine intere.¹⁷ Questi risultati sollevano interrogativi sulla tempistica della gonadectomia e la sua associazione con lo sviluppo di emangiosarcoma. La sterilizzazione precoce, effettuata prima del primo ciclo estrale, impedirebbe alle potenziali cellule neoplastiche di essere esposte agli estrogeni, riducendo così il rischio di cancerogenesi. Al contrario, dopo diversi cicli estrali, le cellule potenzialmente cancerose sarebbero sensibilizzate agli estrogeni, che eserciterebbero un effetto protettivo finché la femmina rimane intera. Tuttavia, se la femmina viene sterilizzata dopo diversi cicli estrali, rimuovendo così l'influenza degli estrogeni, le cellule sensibilizzate possono diventare neoplastiche, aumentando il rischio di emangiosarcoma rispetto alle femmine sterilizzate precocemente.¹⁸ Uno studio su linee cellulari di emangiosarcoma ha evidenziato che livelli elevati di ormone luteinizzante (LH), una condizione che si verifica nei cani sottoposti a gonadectomia, interagiscono con i recettori per LH presenti sulle cellule neoplastiche, stimolandone la proliferazione.¹⁹ Un ulteriore studio condotto su cani di razza Golden retriever solleva una serie di ipotesi sulla probabilità di diagnosi di emangiosarcoma in relazione al ses-

so e allo stato riproduttivo.²⁰ In particolare, fino a circa 8 anni di età, la probabilità di diagnosi è bassa e simile tra tutti i sessi e stati di sterilizzazione. Tra 8 e 10 anni, i maschi, sia interi sia castrati, mostrano un aumento relativamente maggiore del rischio rispetto alle femmine. Dopo i 10 anni, la probabilità di diagnosi nelle femmine intere rimane costante e inferiore rispetto a qualsiasi altro gruppo, mentre nelle femmine sterilizzate aumenta fino a raggiungere livelli simili a quelli dei maschi, sia interi sia castrati.²⁰ È necessario indagare ulteriormente se i risultati ottenuti sulle femmine di Golden retriever possano essere estesi ad altre razze, particolarmente a quelle più soggette allo sviluppo di emangiosarcoma. Un altro studio, che copre un arco temporale di 40 anni, suggerisce che anche nei cani maschi la castrazione sia associata a un aumento del rischio di sviluppare emangiosarcoma.⁷ Questo dato è coerente con quanto osservato nei pazienti umani trattati con steroidi androgenico-anabolizzanti.²⁰ Infine, i cani maschi di razza German Shorthaired Pointer castrati prima dei 6 mesi hanno mostrato un aumento significativo del tasso di sviluppo di emangiosarcoma (8%), rispetto ai maschi interi (1%).²¹

Se l'eziologia rimane ancora incerta, si è fatta invece maggiore chiarezza sull'origine cellulare dell'emangiosarcoma. Sebbene in passato fosse stata accreditata la sua origine dalle cellule endoteliali mature poi trasformatesi, studi recenti indicano che l'emangiosarcoma deriva invece dalle *cancer stem cell* pluripotenti che risiedono nel midollo osseo e in altri organi deputati all'emopoiesi.^{22,23} Tali cellule, definite *cellule nutrici*, supportano l'emopoiesi e tutti i suoi costituenti, inclusi i vasi sanguigni. Questa teoria è stata confermata in diversi studi molecolari, basandosi sull'espressione, da parte delle cellule di emangiosarcoma, di CD34, CD45, CD133 e KIT, tipiche dei precursori endoteliali. Un altro aspetto importante emerso da questi studi è che le cellule di emangiosarcoma in coltura presentano proprietà fenotipiche suggestive di un'origine midollare e, in particolare, dalle cellule staminali, conservando quindi caratteristiche di auto-rinnovo e chemioresistenza.²³ Questo aspetto potrebbe dunque rivestire un'importanza significativa nel contesto della nota resistenza di questa malattia ai trattamenti, poiché le cellule nutrici sono caratterizzate da un'elevata resistenza agli insulti tossici, inclusi chemioterapia e radioterapia.

Una volta migrate dal midollo osseo, queste cellule si localizzano in diverse nicchie tissutali, trovando nella milza un ambiente particolarmente favorevole alla proliferazione, seguita dal fegato e dall'atrio destro o auricola.²³ Il microambiente della nicchia e le traslocazioni cromosomiche rappresentano potenziali eventi genetici e biologici in grado di contribuire alla trasformazione del-

le cellule progenitrici.²²

Studi sul profilo di espressione genomica su larga scala di emangiosarcomi primari hanno inoltre identificato tre distinti sottotipi trascrizionali derivanti da un progenitore comune, ulteriormente classificati come angiogenici, infiammatori e adipogenici, associati rispettivamente a processi di angiogenesi, infiammazione e adipogenesi.^{24,25} L'espressione dei geni coinvolti in questi specifici sottotipi trascrizionali riflette anche la composizione del microambiente tumorale, evidenziando la potenziale interazione tra ipossia e infiammazione durante lo sviluppo del tumore. Anche la prognosi sembra variare tra i sottotipi, con quello infiammatorio associato a una sopravvivenza mediana più lunga.²⁴ La distinzione dei tre sottotipi si basa sull'analisi di specifiche mutazioni somatiche che si verificano più frequentemente nei geni driver dei cani colpiti: l'oncogene *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha* (PIK3CA),²⁶⁻³² l'oncogene *neuroblastoma rat sarcoma virus* (NRAS)^{26,28-30} e l'oncosoppressore *tumor protein p53* (TP53).²⁶⁻³³ Le alterazioni nelle vie NRAS e PIK3CA possono verificarsi, rispettivamente, fino al 24% e al 46% degli emangiosarcomi canini.²⁴ Sebbene segnalate, le mutazioni somatiche che riguardano i geni *phosphatase and tensin homolog* (PTEN),^{27,30-32,34} *AKT1*,²⁷ *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A),²⁷ *RAS p21 protein activator 1* (RASA1),³¹ *phospholipase C gamma 1* (PLCG1)^{27,30,32} e *epidermal growth factor receptor* (EGFR)²⁷ sono invece meno frequenti. Nei Golden retriever i profili di espressione genica sono distinti rispetto ad altre razze, con una maggiore frequenza di mutazioni nei geni AKT e PIK3CA.^{28,35} Le alterazioni in particolare di queste vie molecolari giocano un ruolo cruciale nella patogenesi, come evidenziato dalla loro presenza in specie diverse ed evolutivamente distanti (uomo, cane, zebrafish), suggerendo un meccanismo conservato che contribuisce allo sviluppo del tumore.³⁶

In uno studio su 508 cani, le mutazioni di PTEN e TP53 sono risultate associate a un aumento del rischio di morte, mentre la mutazione di NRAS si è correlata a un rischio inferiore.¹⁷⁵

Questi dati sottolineano un concetto ormai consolidato anche per tumori con caratteristiche istologiche simili: le basi genetiche della tumorigenesi consentono di suddividere i tumori in sottogruppi biologicamente distinti, che non possono essere identificati in assenza di un'analisi genomica approfondita.

Nell'insieme appare dunque evidente come l'emangiosarcoma sia un tumore estremamente eterogeneo. Gli sforzi futuri dovranno concentrarsi sulla comprensione del funzionamento delle diverse mutazioni in relazione ai sottotipi trascrizionali, al fine di chiarirne i meccanismi, valutarne l'impatto sulla clinica e sviluppare strategie preventive e terapeutiche mirate.

EPIDEMIOLOGIA

Nel cane, l'emangiosarcoma rappresenta circa il 2% dei tumori e il 50-66% delle neoplasie spleniche maligne.^{1,6,37,38}

La regola dei due terzi, secondo cui due terzi delle lesioni spleniche sarebbero di natura maligna e, tra queste, due terzi sarebbero emangiosarcomi,³⁹ risale al 1989 ed è stata più recentemente messa in discussione.^{40,41} Se la lesione splenica è un riscontro incidentale, nel 70-90% dei casi si tratterebbe di una lesione benigna, e soltanto nel 10-30% di una lesione maligna, tra cui emangiosarcoma (60%), sarcoma istiocitico (10%), linfoma marginale (10%) o altri istotipi (20%).^{40,41,171} Le percentuali si invertono, invece, in presenza di emoaddome.³⁸ L'emangiosarcoma, infatti, è una delle principali cause di rottura splenica spontanea nei cani, rendendola, in caso di emoaddome, un'importante diagnosi differenziale. Sebbene uno studio retrospettivo precedente avesse riportato che l'emangiosarcoma era la diagnosi più frequente nei casi di emoaddome (79%) e che solo il 13% dei cani presentava una lesione benigna,⁴² un recente studio prospettico ha evidenziato dati differenti.³⁸ In particolare, nei cani con emoaddome secondario a rottura splenica, il 37.5% aveva una lesione benigna (iperplasia complessa, ematoma, mielolipoma), risolta con la sola chirurgia, mentre il 62.5% presentava una neoplasia maligna, principalmente emangiosarcoma, costituendo il 96% dei tumori maligni diagnosticati. Inoltre, solo un terzo dei cani con emangiosarcoma splenico e noduli epatici identificati ecograficamente presentava metastasi nel fegato, mentre le restanti lesioni epatiche erano di natura benigna. Gli animali di questo studio erano soprattutto anziani e di grossa taglia.³⁸ Questi dati sono stati recentemente confermati anche da uno studio prospettico multicentrico su 345 cani con emoperitoneo spontaneo secondario a rottura splenica, che ha riportato una prevalenza di lesioni benigne pari al 35.7%, con emangiosarcoma diagnosticato nel 56.2% dei casi, senza alcuna associazione significativa con razza, peso o età del paziente.¹⁷⁰ Dato confermato anche dallo studio precedente di Ziogaite e coautori secondo i quali, in presenza di emoaddome, l'emangiosarcoma rappresenta circa il 50% delle diagnosi.⁴¹ Inoltre, quattro fattori predittivi (trombocitopenia, anemia, diametro ridotto della lesione splenica più grande e presenza di emoperitoneo) sono stati associati ad una maggiore probabilità di diagnosi di emangiosarcoma.^{41,43,44} Sono necessari più studi prospettici e più ampi, ma questi dati preliminari possono essere utili al clinico per orientare i proprietari, in situazioni di emergenza, verso la scelta di procedere con la splenectomia piuttosto che con l'eutanasia.

Nei cani di piccola taglia, invece, le lesioni benigne prevalerebbero su quelle maligne (53-57% vs 43-47%, rispettivamente), ma l'emangiosarcoma rappresenterebbe comunque l'istotipo più comune tra i tumori maligni

(48-67%).^{45,46} In un altro studio condotto su 370 cani di piccola taglia, il 44% dei noduli splenici era non neoplastico, e il 56% era neoplastico, soprattutto maligno (90%).⁴⁸ Tra questi, l'emangiosarcoma era, ancora una volta, l'istotipo prevalente (54%). In tutti gli studi, la presenza di emoperitoneo si associava a una maggiore probabilità di tumore maligno.⁴⁶⁻⁴⁸

L'emangiosarcoma colpisce prevalentemente cani adulti o anziani, di età mediana di 10 anni. Non emerge una predisposizione di sesso chiaramente definita nella popolazione generale.^{5,8,15,42,49} Tuttavia, come precedentemente discusso, alcuni studi hanno suggerito una maggiore prevalenza nei soggetti sottoposti a gonadectomia, in particolare nelle femmine, nei cani di razza e negli individui di taglia grande.^{1,5,7,8,15-17,18,20,51,52}

PRESENTAZIONE CLINICA

La sintomatologia è correlata alla dimensione della/e massa/e, alla eventuale rottura patologica, e alla presenza e sede di metastasi.^{53,54}

I segni clinici generalmente segnalati sono da vaghi ad aspecifici come inappetenza o anoressia, pallore delle mucose, letargia, debolezza, perdita di peso, emesi, diarrea, intolleranza all'esercizio.

La presentazione clinica può essere acuta o iperacuta in caso di rottura patologica della milza oppure manifestarsi in modo prolungato e transitorio, accompagnandosi anche ad altri segni come algia, distensione addominale e presenza di versamento peritoneale emorragico. L'emoperitoneo può avere risoluzione spontanea per riassorbimento o può, in breve tempo, determinare collasso, shock ipovolemico e morte improvvisa per arresto cardio-circolatorio.^{43,55,56}

All'esame fisico diretto del paziente sintomatico si possono riscontrare mucose pallide, aumento del tempo di riempimento capillare, tachicardia, tachipnea, aritmie, algia addominale, splenomegalia, ottundimento del sensorio.

Per la possibile distribuzione multifocale dell'emangiosarcoma, alla presentazione clinica possono risultare interessati tutti gli organi e tessuti con elevata componente vascolare come fegato, omento, peritoneo, reni, polmoni, atrio destro, encefalo, ossa e muscoli, con segni clinici riferibili alle sedi coinvolte come, appunto, emotorace, emopericardio, sincopi, convulsioni, alterazioni della deambulazione.^{53,54,57,58}

Nonostante l'ampia varietà di segni clinici associati all'emangiosarcoma, questo tumore può anche essere un riscontro occasionale in pazienti asintomatici, sebbene questa condizione sia meno frequente.⁴⁰

Le diagnosi differenziali devono essere poste con ematoma, torsione splenica, noduli di iperplasia, trauma, coagulopatie e altre neoplasie, come sarcomi stromali, neoplasie istiocitarie, tumori linfoproliferativi (es. linfoma

marginale) o metastasi di altri tumori.

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Gli esami di laboratorio in corso di emangiosarcoma possono presentare alterazioni variabili a seconda della gravità e della durata del sanguinamento (ad esempio, emoaddome acuto o stitlicidio) o del fatto che la lesione splenica sia o meno un reperto casuale in paziente asintomatico.

Le alterazioni clinico-patologiche più rilevanti possono essere riscontrate all'esame emocromocitometrico e al profilo coagulativo.

Esame emocromocitometrico e profilo biochimico

Le alterazioni a carico della linea eritroide possono essere riassunte in:

- Anemia da perdita: in corso di emorragia acuta per rottura della lesione splenica, è possibile riscontrare anemia normocitica normocromica non rigenerativa (pre-rigenerativa) di entità variabile. Una volta trascorse le 48-72 ore dal fenomeno acuto emorragico o a fronte di uno stitlicidio che perdura da qualche giorno, è possibile evidenziare invece una anemia rigenerativa (presenza di reticolocitosi). Una lesione splenica associata a contestuale emoaddome ha maggior probabilità di essere un emangiosarcoma.⁴³
- Anemia emolitica microangiopatica/da frammentazione: anemia rigenerativa in cui alla valutazione dello striscio ematico si evidenzia poichilocitosi, ovvero eritrociti di forme differenti per la presenza di schistociti, sferociti (rari), cheratociti, ma soprattutto acantociti. Questi ultimi appaiono con protrusioni citoplasmatiche irregolari invece che di forma discoidale, e possono essere riscontrati in differenti condizioni patologiche come processi infiltrativi splenici o in corso di disordini renali ed epatici. Queste anomalie morfologiche eritrocitarie non sono quindi considerate patognomoniche di emangiosarcoma, ma risultano più frequentemente associate a questa neoplasia,⁵⁹ indipendentemente dalla sua localizzazione, sia essa splenica o in altra sede.⁶⁰ La loro formazione in corso di emangiosarcoma pare sia associata al danno meccanico che gli eritrociti subiscono attraversando i vasi tortuosi neoplastici. La presenza di segni di microangiopatia è riscontrata in circa il 12% dei pazienti con emangiosarcoma in assenza di alterazioni clinico-patologiche indicative di coagulopatia intravasale disseminata (CID),⁶¹ che potrebbe mimare le medesime alterazioni morfologiche eritrocitarie.
- Presenza di eritrociti nucleati in assenza di anemia o in corso di anemia non rigenerativa (normoblastemia inappropriata): tale reperto ematologico viene riscontrato nel momento in cui vi è una perdita di controllo nel rilascio di eritrociti nucleati da parte del mi-

dollo osseo o della milza, come ad esempio in corso di alterazioni funzionali del parenchima splenico quali patologie infiltrative.⁶²

È comune riscontrare inoltre trombocitopenia di moderata entità (per lo più da distruzione intra-tumorale e/o da consumo per formazione di coagulo, secondario al sanguinamento o CID) e pan-ipoprotidemia: tali aspetti clinico-patologici sono di più comune riscontro in corso di emoaddome acuto.

Alterazioni biochimiche quali aumento degli enzimi epatici indicativi di un danno epatocellulare o di colestasi possono essere evidenziate in corso di contestuale infiltrazione epatica da parte della neoplasia.

Profilo coagulativo

È riportato che circa il 50% dei pazienti con emangiosarcoma presenta alterazioni clinico-patologiche suggestive di CID, sospettata prevalentemente per la presenza di trombocitopenia, aumento dei prodotti di degradazione della fibrina (FDPs) e ipofibrinogenemia.^{61,64} Tali alterazioni possono essere correlate a una maggiore espressione da parte delle cellule neoplastiche del fattore tissutale, che contribuisce al rischio pro-trombotico.⁶⁵ Al contrario, in uno studio recente, viene riportato che in corso di emangiosarcoma l'iperfibrinogenemia è di comune riscontro come marker di infiammazione acuta correlata al processo neoplastico stesso.⁶⁶

Nuovi biomarcatori: micro-RNA e nucleosomi

Negli ultimi anni sono state studiate differenti tecniche di laboratorio per rilevare la presenza di processi neoplastici mediante biomarcatori da misurare su campioni ematici (cosiddetta biopsia liquida).

Mediante test di biologia molecolare è possibile identificare micro-RNA (miRNA) circolanti.

I miRNA sono brevi RNA non codificanti, di lunghezza media di 22 nucleotidi e rilevati in quasi tutti i fluidi corporei, incluso il sangue.⁶⁷⁻⁷⁰ Mitchell e coautori hanno inizialmente evidenziato il potenziale dei miRNA circolanti come biomarcatori innovativi per la rilevazione di diverse malattie, inclusi i tumori.⁷¹ In particolare, i miRNA vengono rilasciati dalle cellule neoplastiche nel flusso sanguigno in maniera stabile e possono essere rilevati costantemente nel siero. Questa stabilità è garantita dalla loro protezione contro la degradazione grazie a specifiche proteine leganti l'RNA o tramite l'incapsulamento all'interno di esosomi o microvescicole.^{72,73}

Nel caso dell'emangiosarcoma canino, l'identificazione di un marcatore diagnostico precoce è di grande rilevanza. Tuttavia, pochi studi hanno indagato l'utilità dei miRNA circolanti, senza però raggiungere un consenso.^{68,69,74,75} Due studi iniziali non sono riusciti a distinguere l'emangiosarcoma splenico da altre patologie spleniche non neoplastiche.^{68,69} Tuttavia, uno studio più

recente ha dimostrato che un pannello comprendente miR-126-5p, miR-502-3p e miR-452-5p è in grado di classificare con un'accuratezza del 96% i casi analizzati, differenziando efficacemente l'emangiosarcoma dalle lesioni spleniche benigne.⁷⁵

Un altro test, basato sulla metodica ELISA, permette di identificare la presenza di nucleosomi, ovvero frammenti liberi di cromosomi rilasciati in circolo in seguito a differenti processi neoplastici e infiammatori. Purtroppo, per questa ragione, i nucleosomi non sono considerati marker specifici. La loro misurazione in presenza di una lesione splenica ha evidenziato una concentrazione superiore nei processi maligni (prevalentemente emangiosarcoma) e in corso di emoaddome.⁷⁶ Studi preliminari hanno valutato la misurazione dei nucleosomi per la stadiazione dell'emangiosarcoma: la percentuale di pazienti considerati positivi al test e l'entità della concentrazione dei nucleosomi risultano correlate allo stadio di malattia.⁷⁷

Qualità dell'evidenza	Raccomandazione clinica	Forza della raccomandazione clinica
Molto bassa (62)	Un minimum database clinico-patologico comprensivo di esame emocromocitometrico con valutazione dello striscio ematico, profilo biochimico e coagulativo sarebbe consigliato in caso di massa splenica	Condizionata a favore
Moderata (61, 64, 65)	L'esame coagulativo esteso (comprensivo di d-dimeri e FDPs) è indicato per valutare un possibile rischio pro-trombotico o di CID in corso di emangiosarcoma	Forte a favore
Moderata (68, 69, 75, 76, 77)	Nuovi biomarker (es. nucleosomi, mi-RNA) sarebbero utili nell'identificare la presenza di malattia in un paziente con massa splenica	Condizionata a favore

Raccomandazioni espresse unanimemente. Nessuno astenuto per conflitto di interesse e nessuno contrario.

DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

La diagnosi di emangiosarcoma della milza costituisce una sfida diagnostica per il radiologo. La diagnostica per immagini consente di identificare agevolmente lesioni del parenchima splenico, da piccoli noduli a masse di grandi dimensioni. Più difficile è invece la caratterizzazione delle lesioni, poiché in molte situazioni i rilievi sono compatibili sia con lesioni benigne sia maligne.

Con la radiologia addominale è possibile sospettare una grave splenomegalia o la sede splenica di una massa, ma non di definirne l'eziologia. I rilievi sono sovrapponibili in corso di masse benigne, maligne o di altre patologie

spleniche come la torsione. Se la massa è rotta e si associa emoaddome, è in genere evidente il versamento peritoneale. La presenza di noduli peritoneali associati agli altri rilievi indirizza verso una neoplasia maligna metastatica al peritoneo.^{78,79}

L'ecografia standard è in grado, nella maggior parte dei casi, di confermare l'origine splenica della lesione e di restringere le diagnosi differenziali. L'aspetto più tipico dell'emangiosarcoma è di una "complex mass", rilievo che deriva dalla presenza di ampie aree di emorragia intralesionale che rendono la massa eterogenea. Tuttavia, anche una neoformazione benigna che va incontro a rottura e formazione di un ematoma ha caratteristiche ecografiche simili.⁷⁸⁻⁸¹ Questo è vero anche per i noduli di iperplasia splenici, frequentemente riscontrati negli animali anziani che, se non associati a ematoma, si presentano spesso ipo- o iperecogeni e di piccole dimensioni. Anche in questo caso non si può escludere completamente un'eziologia neoplastica. Le lesioni a bersaglio ("target lesions"), con centro iperecogeno e area periferica ipoecogena) sono state più frequentemente associate alle metastasi spleniche.⁸² Il campionamento mediante ago aspirato e il follow-up ecografico sono strategie che si possono utilizzare per ottenere ulteriori informazioni e monitorare la lesione nel tempo.

L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) permette di valutare nel dettaglio il pattern vascolare delle lesioni, ma non è in grado di distinguere tra emangiosarcoma e altre neoformazioni spleniche, benigne o maligne.⁸³ La tomografia computerizzata (TC) multifase dinamica è un'altra tecnica che consente di studiare la vascolarizzazione delle lesioni addominali ed è considerata utile nella differenziazione tra i diversi tipi di masse spleniche.⁸⁴⁻⁸⁵

Per una diagnosi definitiva di emangiosarcoma, è tuttavia necessario l'esame istologico della massa, che si ottiene solo dopo la splenectomia. L'ago aspirato ecoguidato di una massa splenica è generalmente semplice da eseguire, ma la sua accuratezza diagnostica è limitata rispetto all'istologia della lesione.⁸⁶ Infatti, a causa dell'emodiluizione, non sono infrequenti i falsi negativi, risultando in una bassa sensibilità (64%), oltre al rischio di impianto iatrogeno ("seeding") e di sanguinamento nel caso di massa cavitata splenica.⁸⁷⁻⁹⁰

Prima o dopo la splenectomia, è necessario effettuare una accurata stadiazione del paziente con emangiosarcoma (Tabella 1). La scelta delle metodiche di imaging da utilizzare varia da una stadiazione con tecniche di base (radiografie del torace, ecografia addominale ed ecocardiografia) alla diagnostica avanzata con TC total body. La scelta tra i due approcci va calibrata in base a numerosi fattori: risultati della visita clinica e delle indagini strumentali iniziali, disponibilità delle attrezzature, eventuale urgenza clinica, ed impatto economico per il proprietario.

La radiologia del torace, che deve includere tre proiezioni (le due laterali e una sagittale, preferibilmente ventrodorsale), ha una buona sensibilità nella ricerca delle metastasi polmonari. In due studi che includevano cani con emangiosarcoma, la sensibilità riportata nell'identificazione radiologica delle metastasi è risultata pari a 78-79%. Il pattern più frequentemente riscontrato era di lesioni polmonari nodulari multiple, diffuse a tutti i lobi polmonari, a margini mal definiti e confluenti.^{91,92} Erano tuttavia riportati anche noduli a margini definiti e aree di infiltrato alveolare che corrispondevano ad emorragie polmonari.

Un recente studio ha indagato il valore prognostico dell'aumento di dimensioni dei linfonodi sternali evidenziato mediante esame radiografico in pazienti con emoperitoneo sottoposti a splenectomia, concludendo che tale reperto non dovrebbe essere considerato un indicatore prognostico negativo.¹⁷¹ Infatti, non è emersa alcuna differenza significativa nella probabilità di sopravvivenza tra i cani con patologia splenica, indipendentemente dalla presenza o meno di linfadenopatia sternale. Tuttavia, nei cani con emangiosarcoma o altre neoplasie spleniche, la presenza di linfadenopatia sternale è risultata associata a una sopravvivenza inferiore, suggerendo un possibile valore predittivo in caso di patologia splenica maligna.¹⁷¹

L'ecografia addominale viene utilizzata non solo per la diagnosi della lesione splenica ma anche ai fini della stadiazione. Spesso nella milza, oltre alla lesione principale, sono presenti altri noduli potenziali sede di estensione del tumore. Gli organi che devono essere valutati più accuratamente sono il fegato ed il peritoneo. Tuttavia, le lesioni metastatiche da emangiosarcoma possono coinvolgere qualsiasi organo addominale, pertanto ogni alterazione focale di organo va segnalata. Qualsiasi nodulo epatico va considerato come potenziale sede di metastasi. Le lesioni particolarmente sospette sono quelle con pattern a bersaglio ("target lesions").⁸² Tuttavia, nei cani anziani, le lesioni nodulari iperplastiche benigne epatiche sono molto frequenti, pertanto il riscontro di noduli nel fegato non deve essere interpretato come lesioni metastatiche certe, con conseguenti decisioni avverse sul trattamento del paziente.^{78,79,93} In uno studio, solo il 19% delle lesioni epatiche osservate ecograficamente in cani con massa splenica è risultato metastatico, mentre l'81% era istologicamente benigno.⁹⁴ Vanno inoltre ricordati i limiti dell'ecografia nell'identificazione di metastasi epatiche in cani con emoaddome e massa splenica; nello stesso studio l'ecografia non aveva identificato il 22% delle lesioni epatiche, poi invece rilevate durante la chirurgia. Anche le lesioni peritoneali sono talvolta difficili da identificare all'ecografia, perché si confondono con il tessuto adiposo mesenterico/omentale. Un forte sospetto di metastasi si ha in presenza di noduli multipli ipoecogeni o

eterogenei. La presenza di versamento corpuscolato indica generalmente la rottura della lesione o la presenza di un quadro metastatico addominale.

Ruolo dell'ecografia è anche quello di guidare i prelievi (generalmente aghi aspirati) dalle lesioni sospette metastatiche.

La CEUS si è dimostrata un metodo accurato per la identificazione delle metastasi epatiche nei cani con emangiosarcoma splenico. I noduli metastatici presentano un tipico pattern ipovascolare, mentre i noduli benigni sono isovascolari rispetto al parenchima.⁸³

L'ecocardiografia è indicata per valutare l'area cardiaca ed escludere la presenza di lieve versamento pericardico o neoformazioni che possono sfuggire allo studio radiografico del torace. Le sedi preferenziali dell'emangiosarcoma sono l'atrio destro, l'orecchietta o la parete ventricolare destra; pertanto, queste aree vanno valutate con particolare attenzione in quanto le lesioni possono essere molto piccole.⁹⁵

La TC è l'unica metodica di imaging che offre il vantaggio di poter studiare, oltre alla lesione primaria, tutto il paziente e di rilevare metastasi in sedi non raggiungibili con le tecniche di base, per esempio lo scheletro e i tessuti molli del tronco, degli arti e del cranio, incluso l'encefalo.¹⁷³ Inoltre, la TC ha una maggiore sensibilità rispetto alla radiologia convenzionale per i noduli polmonari di piccole dimensioni o localizzati in posizioni sfavorevoli all'identificazione radiografica, per esempio in sede subpleurica.⁹⁶ L'utilizzo della angio-TC multifase consente di valutare le lesioni primarie (milza e/o area cardiaca) e metastatiche durante le fasi arteriosa, portale e venosa. Secondo un recente studio, una elevata percentuale di metastasi di emangiosarcoma si identificava grazie ad un tipico pattern ("SPLASH sign, spotty to linear or more amorphous enhancement") in una fase vascolare precoce (arteriosa o portale).⁹⁷ Altra caratteristica delle metastasi polmonari da emangiosarcoma è il cosiddetto "halo sign", un'area di sfumata iperattenuazione del parenchima polmonare attorno al nodulo, riscontrata in questo studio nel 72,7% delle metastasi polmonari. La valutazione dell'area cardiaca può beneficiare dell'utilizzo di una particolare tecnica, la cardio-TC sincronizzata con l'ECG ("ECG-gated cardio-CT"), che consente una visualizzazione più accurata delle strutture cardiache, in quanto elimina gli artefatti da movimento legati all'attività cardiaca e sfrutta il transito del mezzo di contrasto nelle diverse fasi di riempimento delle camere e di vascolarizzazione delle lesioni.⁹⁸

Allo stato attuale l'esperienza di utilizzo della risonanza magnetica (RM) nello studio delle patologie spleniche si limita a sporadici case reports.^{99,100} I lunghi tempi di acquisizione necessari per l'esplorazione di ampie regioni anatomiche, insieme ai costi più elevati, rappresentano un limite di applicazione di questa metodica.

La PET-CT con 18-fluorodeossiglucosio (18FDG), ampiamente usata in oncologia umana, sta trovando crescente applicazione anche in medicina veterinaria. In uno studio è stata utilizzata in cani con emangiosarcoma splenico per valutarne l'utilità nello staging e nel monitoraggio, rispetto a radiografie ed ecografie convenzionali.¹⁷⁴ Nove cani con emangiosarcoma in stadio 2 hanno eseguito PET-CT dopo splenectomia e prima della chemioterapia. In due casi, la PET-CT ha rilevato lesioni sospette (massa atriale destra, nodulo epatico) non viste con gli esami standard.¹⁷⁴ Queste lesioni erano più grandi e metabolicamente attive al controllo dopo terapia. La PET-CT potrebbe quindi offrire informazioni prognostiche utili e influenzare le scelte terapeutiche. L'emangiosarcoma è il più frequente tumore cerebrale metastatico nel cane.^{101,102} La RM dell'encefalo è il metodo di elezione nei pazienti che presentano sintomi neurologici compatibili con una patologia endocranica. Il rilievo in RM di lesioni cerebrali multiple associate ad emorragia intralesionale è fortemente suggestivo di metastasi di emangiosarcoma. In alcuni casi, la sintomatologia neurologica può precedere la diagnosi del tumore primario; in queste situazioni è necessario completare l'iter diagnostico per identificare la sede di origine del tumore, con particolare attenzione a milza e regione cardiaca.

Qualità dell'evidenza	Raccomandazione clinica	Forza della raccomandazione clinica
Moderata (91, 92, 96)	Uno studio radiografico completo del torace va sempre effettuato se si opta per una stadiazione con metodiche di primo livello	Forte a favore
Moderata (78, 79, 80, 81)	L'ecografia addominale va utilizzata sia per la diagnosi di lesione splenica sia per la stadiazione della cavità addominale	Forte a favore
Moderata (86, 88, 89, 90)	L'ago aspirato ecoguidato potrebbe essere considerato per indagare un nodulo splenico o una massa in un paziente non candidato per la splenectomia	Condizionata a favore
Moderata (95)	L'ecocardiografia completa la stadiazione di un cane con massa splenica per escludere la presenza di masse della regione cardiaca	Forte a favore
Moderata (83)	L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) potrebbe essere considerata per la valutazione di sospette lesioni metastatiche epatiche in pazienti non esaminati con TC. Non trova utilità nella differenziazione tra masse spleniche maligne e benigne.	Condizionata a favore

Moderata (84, 85, 98, 173)	La TC total body è il metodo di imaging più accurato per la diagnosi e stadiazione preoperatoria completa dell'emangiosarcoma splenico	Forte a favore
Moderata (102, 173)	La RM del cranio è la metodica di elezione per cani presentati con sintomi neurologici che suggeriscono una possibile disseminazione metastatica cerebrale	Forte a favore

Raccomandazioni espresse unanimemente ad eccezione di Federica Rossi per la valutazione della voce bibliografica 97, e di Laura Marconato e Federica Rossi per la valutazione della voce bibliografica 173. Nessuno contrario.

CITOLOGIA

Esame citologico della lesione splenica

La valutazione di preparati citologici ottenuti mediante agoinfissione o agoaspirazione di lesioni spleniche da emangiosarcoma può risultare complessa, non solo a causa dell'elevata emodiluizione, ma anche per il pleomorfismo che le cellule assumono, da fusato a poligonale. Le caratteristiche cito-morfologiche più comunemente riscontrate sono: marcata componente ematica associata a presenza di granulociti neutrofilici e più rari eosinofili di fondo, vacuolizzazioni citoplasmatiche, coesività tra i gruppi cellulari con possibile disposizione pseudo-acinare, cellule apoptotiche, reperti di eritrofagocitosi ed ematopoiesi extramidollare.¹⁰³ La morfologia epitelioidale e il riscontro di formazioni pseudo-acinari potrebbero indirizzare erroneamente verso una diagnosi di neoplasia epiteliale.

Esame citologico del versamento addominale (emoaddome)

In caso di emangiosarcoma splenico rotto è comune il

Tabella 1 - Stadiazione dell'emangiosarcoma splenico secondo il sistema TNM.

T	N	M
T0: nessuna evidenza di neoplasia	N0: linfonodi regionali non interessati	M0: nessuna evidenza di metastasi a distanza
T1: diametro <5 cm e confinato ad un sito primario	N1: linfonodi regionali interessati	M1: metastasi a distanza
T2: diametro ≥5 cm, oppure rotto	N2: linfonodi distanti interessati	
T3: invasione di strutture adiacenti		
Stadio I: T0-1, N0, M0; tumore non rotto di diametro maggiore <5 cm Stadio II: T1-2, N0-1, M0; tumore rotto e/o con metastasi nodali e/o di diametro maggiore ≥5 cm Stadio III: T2-3, N0-2, M1; tumore che invade le strutture adiacenti o ha dato metastasi a distanzabradicardia/tachicardia.		

riscontro di emoaddome. Dal versamento emorragico si può ottenere il valore di ematocrito ed allestire preparati citologici. I reperti citologici più comuni includono macrofagi schiumosi in eritrofagocitosi o impegnati nella fagocitosi di prodotti di degradazione dell'emoglobina (reperti di emorragia recente e non recente, rispettivamente) e cellule mesoteliali reattive. Purtroppo, è estremamente raro identificare la presenza di cellule neoplastiche nei versamenti cavitari.⁶³

ISTOLOGIA

Istologicamente l'emangiosarcoma è una neoplasia infiltrante, spesso caratterizzata da ampie aree di emorragia, necrosi e trombosi. La morfologia cellulare e l'architettura sono molto variabili: si va da trabecole che delimitano spazi vascolari ad aree solide costituite da fasci o tappeti di cellule epitelioidi con elevato pleomorfismo. La più recente classificazione dei tumori dei tessuti molli identifica tre sottotipi principali:¹⁰⁴

- *Emangiosarcoma ben differenziato/convenzionale*: costituito da canali vascolari ematici definiti, irregolarmente anastomizzati, delimitati da una o più file di cellule endoteliali da piatte a rigonfie, con nuclei grandi e spesso ipercromatici. Le cellule neoplastiche si dispongono frequentemente in papille endoluminali.
- *Emangiosarcoma kaposiforme/cellule fusate*: presenta aree con sottili vasi ematici alternate a fasci e aggregati di cellule neoplastiche fusate con elevate atipie e attività mitotica.
- *Emangiosarcoma epitelioide*: costituito da tappeti di cellule neoplastiche di forma da fusata a poligonale, cubica, ovale o rotonda, con nucleo voluminoso, cromatina vescicolosa e nucleolo prominente. Il citoplasma può contenere un lume vascolare e le cellule neoplastiche possono mostrare eritrofagocitosi. La conta mitotica è generalmente elevata e sono presenti cellule multinucleate. Gli spazi vascolari sono rari e delimitati da cellule neoplastiche cubiche rigonfie.

A carico della milza si riscontrano tutti e tre i sottotipi istologici, non raramente anche in modo combinato all'interno della stessa neoplasia.

Sebbene l'emangiosarcoma presenti spesso caratteristiche istologiche tipiche, tali da rendere semplice la diagnosi in sezioni colorate con Ematossilina-Eosina, in alcuni casi la diagnosi può risultare complessa a causa delle caratteristiche intrinseche della neoplasia. In particolare, in tutti i sottotipi di emangiosarcoma è comune la presenza di estese aree necrotiche ed emorragiche, riscontrabili anche in lesioni spleniche benigne, che possono occupare interamente le sezioni istologiche, esitando in possibili falsi negativi.^{105,106} In uno studio sono state esaminate 413 sezioni istologiche ottenute da 50 milze interamente sottoposte ad esame istologico, per le quali era stata formulata una diagnosi di emangiosarcoma.¹⁰⁷

In media, sono state esaminate 8,1 sezioni per caso e, di queste, 279 (67,55%) contenevano la neoplasia. Tuttavia, considerando ciascun caso singolarmente, la percentuale di sezioni contenenti la neoplasia è variata tra l'11,1% e il 100%.

Tramite simulazione Monte Carlo, si è visto che l'esame di 5 sezioni garantiva una probabilità del 95% di individuare la neoplasia, che saliva al 98% con 10 sezioni.

Nei casi in cui la neoplasia presenti scarsa differenziazione cellulare o un pattern di crescita che mimica altri sarcomi, come il sottotipo a cellule fusate, la colorazione immunoistochimica può essere utile per chiarire la diagnosi. In uno studio recente è stato proposto un algoritmo diagnostico basato su un pannello immunoistochimico, in cui le cellule di emangiosarcoma esprimono CD31, CD34 e Fattore VIII.¹⁰⁸ Tali marcatori non erano espressi da altri tumori istologicamente simili, come sarcomi stromali, linfomi, e sarcomi istiocitici/emofagocitici.

Gli emangiosarcomi epitelioidi sono composti da cellule altamente pleomorfe, disposte in cordoni, isole, nidi o aree solide, che possono ricordare i tumori epiteliali. In uno studio recente, il 27% degli emangiosarcomi splenici epitelioidi esprimeva citocheratina. Questo fenomeno, documentato anche nell'angiosarcoma epitelioide dell'uomo, riflette un processo di transdifferenziazione o una plasticità fenotipica delle cellule tumorali endoteliali, piuttosto che una reale differenziazione epiteliale. Gli autori consigliano pertanto di includere nel pannello immunoistochimico marker vascolari, come CD31, per evitare diagnosi errate di carcinoma.¹⁰⁹

Attualmente non esiste un sistema di grading istologico con valore prognostico universalmente accettato dalla comunità scientifica. Una conta mitotica $\geq 11/10$ campi ad alto ingrandimento (HPF) è stata significativamente associata ad una più breve sopravvivenza.¹³⁵ A ulteriore supporto dell'importanza dell'attività proliferativa, un indice Ki67 $\geq 56\%$ si è dimostrato un fattore prognostico negativo.¹¹⁰

CHIRURGIA

La gestione preoperatoria dei pazienti differisce a seconda che la massa splenica sia un riscontro casuale o venga identificata in un animale emodinamicamente instabile a causa dell'emoaddome.

La stabilizzazione clinica preoperatoria è quindi fondamentale prima dell'intervento chirurgico in corso di emoperitoneo non traumatico, così come un adeguato controllo perioperatorio.¹¹¹

Decidere se sottoporre a chirurgia esplorativa un paziente con emoperitoneo per rottura di una massa splenica, considerando che nel 60% dei casi può trattarsi di un emangiosarcoma, rappresenta un vero e proprio dilemma.³⁸ In uno studio che ha analizzato il problema, nel 92% dei

casi il fattore che sembrava influenzare maggiormente il processo decisionale era rappresentato dalla qualità di vita dell'animale successiva al trattamento chirurgico. La splenectomia appariva quindi la procedura in grado di offrire una migliore qualità di vita rispetto alle cure palliative (es. emotrasfusione), con conseguente maggiore soddisfazione del proprietario.¹¹²

Procedura chirurgica

La rimozione della milza può essere eseguita mediante tecnica celiotomica oppure, in casi selezionati, mediante tecnica mininvasiva laparo-assistita. La procedura inizia con l'ispezione della cavità addominale per escludere la presenza di metastasi evidenti, soprattutto su fegato, omento e mesentere,⁵⁴ oltre a un'ispezione palpatoria delle vene porta e splenica per escludere la presenza di trombi. Il riscontro di tessuti sanguinanti o di aspetto anormale ne motiva un campionamento bioptico; infatti, la presenza di lesioni epatiche multiple di colore scuro e/o di noduli sanguinanti è riportata essere maggiormente associata a tumori maligni.^{43,113} Il campionamento random del fegato, in assenza di lesioni macroscopicamente evidenziazabili, non è indicato a causa della scarsa sensibilità diagnostica.¹⁷²

Splenectomia totale

Tecnica celiotomica

La splenectomia totale può essere eseguita mediante tecnica di legatura ilare oppure con la tecnica descritta da Hosgood e coautori.¹¹⁴ Nel primo caso i vasi splenici ilari vengono recisi singolarmente all'ingresso dell'ilo splenico, mentre, nel secondo caso, si eseguono tre legature rispettivamente su arterie e vene splenica, gastroepiploica sinistra e gastriche brevi, con notevole riduzione dei tempi chirurgici. Entrambe le tecniche possono essere effettuate utilizzando filo da sutura, clip metalliche (per vasi di diametro non superiore a 3 mm) o mediante dispositivi di sintesi (elettrocoagulatori bipolari avanzati o bisturi armonici, limitatamente a vasi di diametro massimo di 7 e 5 mm, rispettivamente) con tempo chirurgico significativamente più breve, ma limitatamente a vasi di diametro massimo di 7 mm.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Le aderenze omentali, qualora presenti, devono essere rimosse en bloc con la milza.^{54,115,116}

Qualora i linfonodi portali, splenici o gastrici apparissero alterati per forma e dimensione, ne è consigliata la rimozione e successiva analisi istopatologica.

Tecnica laparoscopica assistita

La splenectomia mediante laparoscopia assistita è descritta sia con accesso a porta singola multicanale, sia con approccio multiporta. L'utilizzo della tecnica è consigliato solo in casi selezionati: pazienti emodinamicamente stabili in assenza di emoperitoneo e con masse di di-

mensioni moderate (massimo 6 cm di diametro o 55,2 cm³/kg).¹¹⁸⁻¹²² Ulteriori limiti della tecnica mininvasiva sono rappresentati dalla necessità di ampliare uno dei fori per la rimozione della milza dalla cavità addominale e dal consentire solo una limitata esplorazione dell'intero addome per escludere la presenza di metastasi.^{54,123}

Mortalità perioperatoria e prognosi

Il tasso di mortalità perioperatoria riportato è circa del 7% e più comunemente associato a sindromi trombotiche (portale e polmonare) o coagulopatie (CID), evidenziando l'importanza di identificare e correggere l'instabilità emodinamica derivante dalla perdita di sangue.^{111,117,124}

I principali fattori prognostici negativi sono trombocitopenia, anemia (ematocrito <30%), coagulopatie e presenza di aritmie.^{111,117,125} In due studi la necessità di transfondere il paziente durante o dopo la splenectomia aumentava il rischio di mortalità,^{117,125} tale dato va interpretato con cautela, perché è verosimile che cani con alterazioni ematologiche gravi o coagulopatie siano anche quelli che più spesso ricevono una trasfusione di sangue o emoderivati.

Il tempo mediano di ospedalizzazione post-chirurgica riportato è breve e solitamente inferiore a 2 giorni.³⁸ Per i pazienti trattati con la sola splenectomia la prognosi è infausta, con tempo di sopravvivenza di circa 1-3 mesi.^{54,108,126-128} Pertanto, la sola terapia chirurgica è da considerarsi un trattamento palliativo in grado di prevenire la rottura dell'organo, evitando il conseguente sanguinamento e shock ipovolemico, oltre a rappresentare anche un'efficace terapia per l'emoperitoneo qualora presente. Il breve tempo di ospedalizzazione post-operatorio e la soddisfazione dei proprietari sulla rapida ripresa degli animali la rendono, quando indicato, il trattamento di prima scelta.

Qualità dell'evidenza	Raccomandazione clinica	Forza della raccomandazione clinica
Moderata (54, 111, 124)	In corso di emoperitoneo non traumatico, una stabilizzazione emodinamica preoperatoria migliora la prognosi perioperatoria	Forte a favore
Moderata (38, 111, 112, 117)	La terapia chirurgica garantisce una rapida ripresa dell'animale e si associa ad una bassa mortalità perioperatoria	Forte a favore
Moderata (54, 115, 116, 118, 119, 121)	Per eseguire la splenectomia è preferibile la tecnica celiotomica	Forte a favore
Moderata (120, 121, 122)	La tecnica laparo-assistita è da riservare a casi selezionati e con masse <6 cm o 55,2 cm ³ /kg in assenza di emoperitoneo	Forte a favore

Moderata (126, 127, 128)	Per i cani trattati con la sola splenectomia, la sopravvivenza mediana si pone intorno a 1-3 mesi	Forte a favore
Moderata (43, 54, 113)	Il riscontro di anomalie a carico di organi extrasplenicici durante l'ispezione chirurgica ne motiva il campionamento biotico	Forte a favore
Molto bassa (Opinione espressa dal Panel)	In presenza di sospette macrometastasi, la chirurgia va discussa con il proprietario caso per caso/ su base individuale	Forte a favore

Raccomandazioni espresse unanimemente. Nessuno astenuto per conflitto di interesse e nessuno contrario.

TRATTAMENTO CHEMIOTERAPICO E PROGNOSI

Chemioterapia convenzionale per il trattamento dell'emangiosarcoma non metastatico

L'approccio chirurgico rappresenta lo standard di riferimento nel management clinico dell'emangiosarcoma splenico. Tuttavia, la sola chirurgia è spesso associata a brevi tempi di sopravvivenza, pur offrendo un miglioramento della qualità di vita del paziente. L'utilizzo della chemioterapia adiuvante è diventato quindi parte integrante del trattamento dell'emangiosarcoma splenico sin dalla fine degli anni '80, quando vari trial clinici hanno individuato nella doxorubicina, con o senza l'aggiunta di altri chemioterapici, il farmaco chiave.^{54,108}

I vari protocolli pubblicati includono doxorubicina somministrata in mono-chemioterapia, doxorubicina e ciclofosfamide, doxorubicina, ciclofosfamide e vincristina. I tempi di sopravvivenza mediana per questi protocolli sono compresi tra 4 e 6 mesi, con meno del 10% dei cani che sopravvive oltre l'anno dalla splenectomia.

Tuttavia, la maggior parte degli studi controllati raramente riporta un miglioramento significativo del tempo di sopravvivenza rispetto alla sola chirurgia. Uno studio del 2015 ha per esempio suggerito un miglioramento della sopravvivenza solo nei primi 4 mesi di follow-up.¹²⁹ È stato però recentemente sottolineato come la tempestività nell'inizio di chemioterapia adiuvante (<21 giorni dalla chirurgia) potrebbe avere un impatto positivo nel ritardare l'insorgenza di metastasi.¹³⁰

Studi condotti in medicina umana hanno dimostrato l'importanza dell'associazione di doxorubicina e ifosfamide per il trattamento di sarcomi dei tessuti molli ad alto grado di malignità. L'utilizzo di ifosfamide, da sola o in combinazione con doxorubicina, è stato adottato anche nel trattamento dell'emangiosarcoma splenico con risultati però non altrettanto incoraggianti, e simili alla sola doxorubicina.^{131,132}

L'intensità di dose di un protocollo chemioterapico non è determinata soltanto dal dosaggio del farmaco, ma anche della frequenza con cui questo viene somministrato; a tale scopo in uno studio la doxorubicina è stata somministrata riducendo l'intervallo inter-somministrazione da 3 a 2 settimane. Nonostante il presupposto teorico e la buona tollerabilità del protocollo, i tempi mediani di sopravvivenza non si sono rivelati particolarmente diversi da quelli ottenuti con i convenzionali regimi di somministrazione.^{133,134}

Se da una parte la doxorubicina è considerata un caposaldo nei protocolli chemioterapici per l'emangiosarcoma, dall'altra il rischio di tossicità cardiaca acuta e cronica (tossicità cronica osservata oltre i 180-240 mg/m² totali) ne limita talvolta l'utilizzo in pazienti affetti da patologie cardiache e, generalmente, ne scoraggia l'utilizzo protratto (oltre le 6 somministrazioni). Allo scopo di ridurre il rischio di cardiotoxicità un trial clinico ha analizzato l'effetto di epirubicina nel trattamento adiuvante dell'emangiosarcoma, suggerendo che il suo impiego in mono-chemioterapia poteva essere efficace tanto quanto quello dei protocolli adiuvanti a base di doxorubicina. Nonostante si sia osservata una maggiore incidenza di tossicità gastrointestinale, l'epirubicina è comunque da considerarsi un'alternativa alla doxorubicina in cani con preesistente malattia cardiaca.¹²⁷ Questa strategia è stata poi ripresa in altri trial clinici con risultati sovrapponibili.^{135,136}

La tossicità cardiaca, insieme alle altre molteplici tossicità osservate nei diversi protocolli per emangiosarcoma (quali letargia, anoressia, vomito, diarrea, gastroenterite, febbre, prurito, sepsi e mielosoppressione), ha indirizzato i ricercatori verso l'utilizzo di doxorubicina incapsulata in liposomi (PL-DOX), nel tentativo di ridurre la tossicità e incrementarne l'effetto antineoplastico. Lo sviluppo di sistemi di rilascio di farmaci come i liposomi è infatti una svolta importante nel migliorare il targeting tumorale, nell'aumentare i tempi di rilascio e diminuire la tossicità sistemica. I liposomi hanno dimostrato di raggiungere un tempo prolungato di circolazione per la loro capacità di sottrarsi alla captazione del sistema reticoloendoteliale.^{128,137} PL-DOX ha poi una più lunga emivita di eliminazione plasmatica, ridotta clearance e un ridotto volume di distribuzione.^{128,137} Studi hanno inoltre dimostrato una ridotta tossicità cardiaca rispetto alla doxorubicina libera. Uno studio randomizzato ha valutato l'uso di PL-DOX o doxorubicina come terapia adiuvante nei cani con emangiosarcoma splenico, rivelando l'assenza di differenze significative tra i due composti; tuttavia, nel gruppo PL-DOX sono stati riscontrati molteplici effetti avversi, tra cui reazioni anafilattiche ed eritrodisestesia palmo-plantare.¹³⁷ Un altro studio ha valutato l'uso di PL-DOX intracavitario in regime adiu-

vante in cani con emangiosarcoma splenico;¹²⁸ tuttavia i tempi di sopravvivenza registrati e la frequente insorgenza di metastasi epatiche ed emoperitoneo al momento della morte dimostravano la mancanza di beneficio clinico di questa strategia.

Più recentemente, è stato investigato il ruolo del carboplatino nel trattamento adiuvante dell'emangiosarcoma splenico, con risultati ancora una volta non dissimili dall'utilizzo di antracicline in monochemioterapia o in regimi combinati.¹³⁸

L'aggiunta di inibitori della COX-2 ai protocolli di trattamento adiuvante per i cani con emangiosarcoma è stata anch'essa valutata senza apportare però miglioramenti nella prognosi.¹³⁹

Nell'intento di ottimizzare i protocolli polichemioterapici, è stata anche studiata l'associazione di doxorubicina e dacarbazina (DTIC).¹⁴⁰ Questa combinazione ha portato ad un aumento del tempo mediano alla metastatizzazione e della sopravvivenza mediana nei cani trattati rispetto a quelli trattati con doxorubicina e ciclofosfamide. Tuttavia, questo studio includeva un campione limitato di soli 27 cani, di cui 9 trattati con DTIC, ed emangiosarcoma localizzato in varie sedi anatomiche, oltre a quella splenica, limitando quindi notevolmente l'attendibilità dei risultati ottenuti.

Strategie antiangiogeniche nell'emangiosarcoma non metastatico

La chemioterapia antiangiogenica (o a dosaggio metronomico) è una promettente alternativa ai protocolli di chemioterapia convenzionale. A differenza della chemioterapia tradizionale, l'obiettivo principale di questo approccio terapeutico è inibire la proliferazione delle cellule endoteliali immature che apportano vascolarizzazione al tumore. Diversi meccanismi possono spiegare gli effetti antiangiogenici della chemioterapia a dosaggio metronomico: le cellule endoteliali in attività replicativa possono avere maggiore sensibilità ai farmaci chemioterapici, con effetti mediati anche dalla produzione di fattori antiangiogenici come trombospondina-1 e dalla riduzione di precursori endoteliali a livello midollare.

I farmaci più utilizzati a tale scopo, e con maggiore evidenza scientifica, sono ciclofosfamide in associazione a FANS, e più recentemente la talidomide. I protocolli metronomici, basati sull'utilizzo di un FANS in associazione a ciclofosfamide a basse dosi giornaliere sono stati valutati nel trattamento adiuvante dell'emangiosarcoma, rivelando prognosi sovrapponibili a quelli di protocolli a base di doxorubicina.^{136,141,142}

La chemioterapia metronomica è stata anche utilizzata in regime di "mantenimento" in pazienti che avevano completato protocolli chemioterapici dose-intensi. Due studi, che hanno valutato l'esito di cani con emangiosarcoma splenico trattati in regime adiuvante

con doxorubicina o doxorubicina seguita da chemioterapia metronomica, hanno però mostrato risultati contrastanti.^{134,143} Uno di questi studi, che includeva anche la somministrazione di talidomide all'interno del protocollo metronomico, ha evidenziato un prolungamento del tempo mediano alla metastatizzazione e del tempo mediano di sopravvivenza rispetto ai cani trattati con sola chemioterapia dose intensa,¹⁴³ mentre l'altro non ha mostrato differenze tra i due gruppi.¹³⁴ Questi risultati potrebbero essere stati influenzati dalle differenze nello stadio della malattia dei pazienti, nonché dall'uso di talidomide in combinazione con ciclofosfamide.

Seppur non statisticamente significativo, un prolungamento del tempo di sopravvivenza mediano e del numero di pazienti vivi ad un anno è stato poi documentato in un'altra popolazione di pazienti che hanno ricevuto doxorubicina adiuvante seguita da terapia metronomica di mantenimento, con concomitante aggiunta di talidomide.¹³⁶ Un recente studio ha indicato un possibile beneficio dell'uso della talidomide dopo splenectomia nei cani con emangiosarcoma: cinque su 15 soggetti trattati con talidomide fino al decesso hanno superato l'anno di sopravvivenza post-intervento.¹⁴⁴

Questi risultati suggeriscono la necessità di ulteriori indagini sul potenziale ruolo della chemioterapia metronomica, che potrebbe offrire risultati pari o superiori rispetto alla sola doxorubicina adiuvante in alcuni cani con emangiosarcoma splenico.

Il trattamento adiuvante con inibitori delle tirosin-chinasi è stato anch'esso oggetto di indagine. Uno studio prospettico ha valutato gli esiti nei cani con emangiosarcoma splenico di stadio I o II trattati con splenectomia, doxorubicina adiuvante e successiva somministrazione di toceranib, in assenza di malattia metastatica al momento del completamento della doxorubicina.¹⁴⁵ I risultati dello studio hanno però evidenziato un'assenza di beneficio a seguito di questa terapia di mantenimento.

Le metalloproteinasi della matrice, legate o secrete dalla membrana cellulare, possono degradare molti componenti della matrice extracellulare e giocano un ruolo importante nelle normali condizioni fisiologiche come la guarigione delle ferite, la gravidanza, e altri processi che coinvolgono il rimodellamento tessutale. La matrice extracellulare costituisce un grave ostacolo per la crescita tumorale e per il processo metastatico. La minociclina, un derivato semisintetico della tetraciclina, caratterizzata sia da proprietà di inibitore delle metalloproteinasi sia antiangiogeniche, è stata somministrata a cani con emangiosarcoma insieme a doxorubicina e ciclofosfamide senza apportare però alcun vantaggio sulla sopravvivenza.¹⁴⁶

Tabella 2 - Protocolli utilizzati per emangiosarcoma splenico in cani sottoposti a splenectomia, per diversi stadi clinici.

Protocollo	VDS	Nr casi	Nr cani con HSA splenico	Stadio clinico I (HSA splenico)	Stadio clinico II (HSA splenico)	Stadio clinico III (HSA splenico)	Stadio I MST	Stadio II MST	Stadio III MST	Tossicità (VCOG G3-G4/moderata-severa)	Referenze bibliografiche
VINC DOX CTX	EV	15	6	2	3	1	145*	145*	145*	Episodi E e GE riportati ma complessivamente NV	150
DOX	EV	46	14	NV	NV	Quasi totalità del campione	172**	172**	172**	Episodi E e GE riportati ma complessivamente NV	151
Ifosfamide	EV	72	6	1	5	0	147*	147*	-	Episodi E e GE riportati ma complessivamente NV	131
DOX CTX Minociclina	EV OS	18	10	2	4	4	273	156	136	NV	146
PL-DOX	EV	34	17	NV	NV	NV	166*	166*	166*	VCOG G3 Anafilassi 17% VCOG G3 ToxEpa 6%	137
DOX	EV	34	17	NV	NV	NV	172*	172*	172*	VCOG G3 GE(v) 6%	137
DOX Ifosfamide	EV	39	16	2	13	1	NV	123	NV	Episodi E e GE riportati ma complessivamente NV	132
DOX+	EV	20	14	0	9	5	-	210	107	Episodi E e GE riportati ma complessivamente NV	133
EPI	EV	59	18	7	3	8	983	98	135	Episodi E e GE riportati ma complessivamente NV	127
MC: Etoposide CTX Piroxicam	OS	33	9	0	9	0	-	178	-	No	141
DOX	EV	33	24	0	24	0	-	133	-	Episodi GE riportati ma complessivamente NV	142
PL-DOX	IC	14	14	0	6	8	-	244	125	PPES moderata/severa: 7%	128
DTIC DOX VINC	EV	24	12	0	4	20	-	125*	125*	Episodi E e GE frequenti ma complessivamente NV	147
VINC DOX CTX	EV OS	28	28	14	3	11	133*	133*	195	Episodi E, SCH e GE riportati ma complessivamente NV	148
DOX Deracoxib	EV OS	21	21	3	7	11	239	120	149	NV	139
DOX	EV	43	43	5	38	0	169*	169*	-	NV	145
DOX → Toceranib	EV OS	43	31	5	38	0	172*	172*	-	NV	145
DOX	EV	208	28	5	17	6	90*	90*	90*	NV	129
MC: CTX FANS	OS	208	13	2	7	4	105*	105*	105*	NV	129
DOX MC: CTX	EV OS	208	13	2	7	4	130*	130*	130*	NV	129
TDM	OS	15	15	0	10	5	-	303	40	No	144
DOX CTX	EV PO	18	15	0	13	2	-	142	NV	VCOG G3 E(n): 5,5% VCOG G3 GE: 5,5%	140
DOX DTIC	EV	9	5	0	2	3	-	NV	NV	VCOG G3 E(n): 44% VCOG G4 E(n): 11%	140
DOX	EV	22	11	1	10	0	168*	168*	-	VCOG G4 E(n): 10%	143
DOX → MC: CTX TDM FANS	EV OS	22	8	0	8	0	-	Non raggiunto	-	VCOG G3 GE(a): 8.3%	143
DOX+	EV	33	15	2	8	5	98*	98*	98*	Episodi E e GE riportati ma complessivamente NV	134

Tabella 2 - segue

DOX+ → MC: CTX	EV OS	33	18	3	10	5	134*	134*	134*	Episodi E e GE riportati ma complessivamente NV SHC: 16%	134
Lomustina AC: DOX MITOX EPI	OS EV	30	30	0	30	0	-	158	-	Episodi VCOG G3 GE e E riportati ma complessivamente NV	135
DOX	EV	37	30	25	6	6	196	117	26	NV	4
DOX +/- CTX	EV	61	39	2	29	8	180*	180*	180*	VCOG G3 E(n): 2,5% VCOG G4 E(n): 5%	142
DOX +/- CTX → MC: CTX	EV + OS	61	22	4	13	5	212*	212*	212*	VCOG G3 E(n): 4,5%	142
DOX	EV	61	10	NV	NV	NV	186*	186*	186*	NV	142
DOX CTX	EV	61	29	NV	NV	NV	178*	178*	178*	NV	142
DOX CTX → MC: CTX	EV OS	61	5	NV	NV	NV	171*	171*	171*	NV	142
DOX → MC: CTX	EV OS	61	16	NV	NV	NV	229*	229*	229*	NV	142
DOX	EV	103	23	0	0	23	-	-	140	VCOG G3 E(n): 4,3% VCOG G4 E(n): 4,3% VCOG G3 GE: 8,6%	149
MC: CTX +/- FANS +/- TDM	OS	103	38	0	0	38	-	-	58	No	149
DOX	EV	43	25	NV	NV	NV	207*	207*	207*	Episodi E e GE riportati ma complessivamente NV	55
Antracicline: Doxorubicina PL-DOX EPI	EV	50	50	8	42	0	NV	144	-	VCOG G3 GE: 5% VCOG G3 E(n): 15% VCOG G4: E(n): 5%	136
MC: CTX, CLB +/- FANS, +/- TDM	PO	20	20	7	13	0	NV	139	-	0	136
AC: DOX EPI → MC: CTX +/- TDM +/- FANS	EV + PO	23	23	4	19	0	NV	314	-	VCOG G3 GE: 4,3% VCOG G3 SHC: 4,3% VCOG G3 E: 4,3%	136
Carboplatino	EV	40	18	8	10	0	341	97	-	No	138
DOX +/- CTX	EV	40	22	7	15	0	207	133	-	NV	138
DOX +/- → MC		70	70	11	59	0	165*	165*	-	VCOG G3-G4 E-GE: 13%	130
DOX <21g +/- → MC		70	39	NV	NV	0	238*	238*		NV	130
DOX >21g +/- → MC		70	31	NV	NV	0	146*	146*		NV	130
Legenda											
Nella sezione tossicità sono riportati solo gli eventi avversi VCOG-CTCAE di grado 3-4 o severi-moderati (se così classificati dagli autori secondo altri schemi), poiché spesso responsabili di riduzioni di dose, modificazione o interruzione del protocollo chemioterapico.											
Abbreviazioni:											
*non specificata ST per diversi stadi; ** non specificata per stadi né per localizzazione di HSA; "→": subito dopo completamento del primo protocollo; "+/-": con l'aggiunta o meno (combinato o alternato); AC: antracicline; CLB: clorambucile; CTX: ciclofosfamide; DOX: doxorubicina; DOX+: doxorubicina ogni 14 giorni; DTIC: dacarbazina; E(a): tossicità ematologica - anemia; ; E(n): tossicità ematologica - neutropenia; E(t): tossicità ematologica - trombocitopenia; EPI: epirubicina; EV: endovenosa; FANS: antinfiammatorio non steroideo; G: grado; GE: tossicità gastroenterica complessiva; GE(a): tossicità gastroenterica - anoressia; GE(d): tossicità gastroenterica - diarrea; GE(v): tossicità gastroenterica - vomito; HSA: emangiosarcoma; IC: intracavitaria; MC: chemioterapia metronomica; MITOX: mitoxantrone MST: tempo mediano di sopravvivenza; NV: non valutabile; PL-DOX: doxorubicina incapsulata in liposomi; PO: somministrazione per via orale; PPES: eritrodissiestesia palmo-plantare; SHC: cistite emorragica sterile; Spl: splenico; TDM: talidomide; VCOG: Veterinary Co-operative Oncology Group; VDS: via di somministrazione; VINC: vincristina.											

Trattamento dell'emangiosarcoma splenico metastatico

Studi hanno dimostrato che i cani con malattia metastatica al momento della diagnosi (stadio III) hanno tempi di sopravvivenza più brevi rispetto ai cani con malattia in stadio I o II.^{54,108} Ad esempio, in caso di emangiosarcoma splenico metastatico, la sopravvivenza mediana dopo splenectomia è inferiore a 2 mesi.^{54,108} L'aggiunta di chemioterapia adiuvante a dose massima tollerata (un'antraciclina come agente singolo, doxorubicina in combinazione con ciclofosfamide o DTIC, o doxorubicina in combinazione con vincristina e ciclofosfamide) è esitata in tempi di sopravvivenza mediani compresi tra 62 e 195 giorni in soggetti con emangiosarcoma metastatico, soprattutto di origine splenica.^{147,148} In particolare, utilizzando l'associazione di doxorubicina, DTIC e vincristina, il tasso di risposta è stato del 47,4% con tempo mediano alla progressione del tumore di 101 giorni e sopravvivenza mediana complessiva di 125 giorni, con incremento fino a 205 giorni in caso di remissione completa (CR). Nei pazienti in cui la risposta della malattia macroscopica al trattamento chemioterapico era valutabile, il 26% otteneva CR, il 21% risposta parziale e il 47% malattia stabile. Tali risultati hanno pertanto suggerito un effetto benefico nel controllo della progressione neoplastica, rafforzando l'idea che DTIC potrebbe contribuire ad un miglioramento della prognosi in cani con emangiosarcoma; tuttavia, venivano messe in evidenza tossicità significative sia ematologiche sia gastrointestinali, e cinque soggetti interrompevano il trattamento per eccessiva tossicità.¹⁴⁷

Uno studio recente ha poi comparato il beneficio di chemioterapia convenzionale, chemioterapia metronomica o nessun trattamento adiuvante in 103 cani con emangiosarcoma splenico sottoposti a splenectomia.¹⁴⁹ I cani trattati con chemioterapia standard avevano un significativo aumento sia del tempo mediano di progressione tumorale (*time to progression*, TTP) sia di sopravvivenza (*survival time*, ST) rispetto ai cani trattati con chemioterapia metronomica (TTP mediano, 134 vs 52 giorni; ST mediano, 140 vs 58 giorni). I soggetti trattati invece con la sola splenectomia avevano il TTP mediano e ST più brevi (28 e 40 giorni, rispettivamente), a conferma della gravità della malattia e dei dati precedentemente pubblicati. Tuttavia, va sottolineato che la tossicità era più frequente nei cani trattati con chemioterapia standard a fronte di un esiguo miglioramento della sopravvivenza.

Nel complesso, la sopravvivenza rimane deludente e la maggior parte dei cani alla fine soccombe a causa della malattia progressiva: sopravvivenza a 6 mesi dello 0% in pazienti trattati con la sola chirurgia, 12% in caso di chemioterapia e 0% ad un anno con qualsiasi forma di trattamento.¹⁴⁹

La tabella 2 riporta i risultati della terapia farmacologica nel trattamento dell'emangiosarcoma del cane.

Qualità dell'evidenza	Raccomandazione clinica	Forza della raccomandazione clinica
Moderata (4, 55, 129)	Nei cani con emangiosarcoma splenico non metastatico, la chemioterapia adiuvante migliora la prognosi rispetto alla sola chirurgia	Forte a favore
Moderata (4, 55, 129, 130, 133, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 145, 146, 150, 151)	I protocolli chemioterapici dose intensi devono preferibilmente includere un'antraciclina, somministrata da sola o in regime polichemioterapico	Forte a favore
Moderata (127, 136)	L'epirubicina è un'alternativa alla doxorubicina, con equivalente efficacia	Forte a favore
Moderata (138)	L'utilizzo di carboplatino sarebbe un'alternativa a doxorubicina, con equivalente efficacia	Condizionata a favore
Moderata (140, 147)	L'aggiunta di DTIC alla doxorubicina potrebbe migliorare il controllo della malattia metastatica e prolungare i tempi di sopravvivenza	Condizionata a favore
Moderata (136, 141)	La terapia metronomica con ciclofosfamide e FANS offrirebbe tempi di sopravvivenza sovrapponibili a quelli della chemioterapia dose-intensa per emangiosarcomi in stadio II	Condizionata a favore
Moderata (143, 144)	La talidomide andrebbe incorporata in protocolli metronomici	Condizionata a favore
Moderata (136, 143)	I cani con emangiosarcoma splenico che hanno completato il protocollo dose-intenso senza aver sviluppato metastasi, dovrebbero ricevere una terapia metronomica di mantenimento	Condizionata a favore
Moderata (147, 148, 149)	La chemioterapia dose-intensa offrirebbe tempi di sopravvivenza più lunghi rispetto a protocolli metronomici in presenza di metastasi	Condizionata a favore
Moderata (149)	Nel trattamento dell'emangiosarcoma metastatico, la terapia metronomica sarebbe preferibile a quella dose intensa, perché meglio tollerata	Condizionata a favore

Raccomandazioni espresse unanimemente ad eccezione di Laura Marconato per la valutazione delle voci bibliografiche 130, 140, 143, 149; di Riccardo Finotello per la valutazione delle voci bibliografiche 136, 140, 143, 149; e di Marina Aralla per la valutazione della voce bibliografica 130. Nessuno contrario.

NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE

Sebbene l'emangiosarcoma continui ad essere considerato incurabile, negli ultimi anni sono emerse nuove strategie terapeutiche che mirano a migliorare il controllo della malattia e la qualità di vita dei cani. Gli studi clinici in corso e un crescente interesse per terapie personalizzate e di precisione potrebbero offrire nuove possibilità terapeutiche per i pazienti affetti da questa malattia.

1) Immunoterapia

L'emangiosarcoma è un tumore immunogeno ("hot tumor") e la malattia metastatica può essere riconosciuta e controllata dal sistema immunitario. Pertanto, l'immunoterapia è diventata la strategia terapeutica sistemica adiuvante più studiata.

Fino ad oggi sono stati pubblicati diversi studi sull'immunoterapia attiva per l'emangiosarcoma del cane. Tuttavia, questi studi hanno esplorato strategie eterogenee, tra cui l'uso di cellule dendritiche, lisati di cellule tumorali e peptidomi. Inoltre, hanno coinvolto diverse sedi ana-

tomiche, cani in stadi clinici differenti e trattamenti concomitanti variabili, come la chirurgia e/o la chemioterapia. I risultati sono descritti nella Tabella 3.

Sebbene non si possano trarre conclusioni definitive, si evince come l'immunoterapia possa essere efficace, soprattutto se integrata in una strategia multimodale.

2) e-BAT

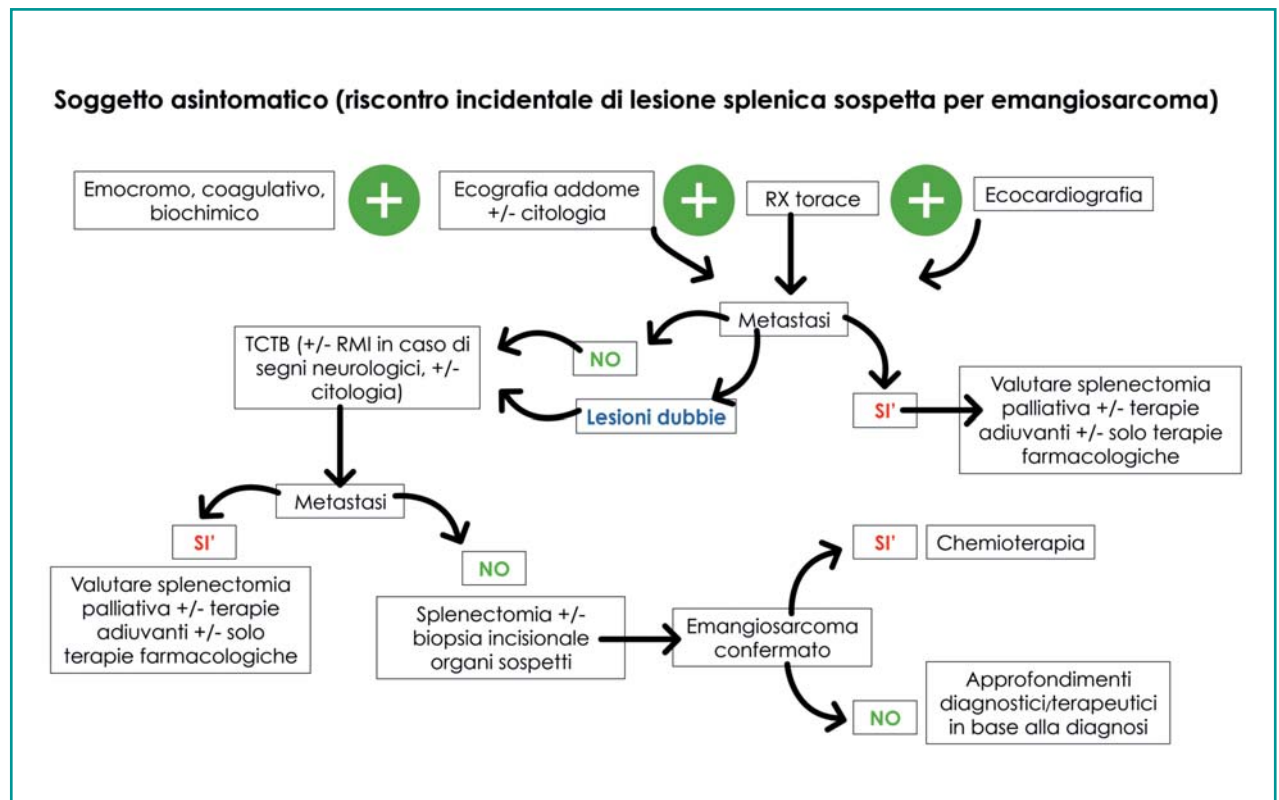
È stato dimostrato che le cellule di emangiosarcoma presentano due proteine sulla loro superficie, che possono essere utilizzate come bersagli terapeutici: il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e il recettore dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi (uPAR). A differenza delle cellule normali, che non esprimono EGFR e uPAR contemporaneamente, le cellule di emangiosarcoma mostrano un'anomala co-espressione di questi due recettori.

e-BAT (acronimo di EGF bispecific angiotoxin) è un'angiotossina bispecifica composta da due proteine progettate per colpire simultaneamente EGFR e uPAR, che vengono utilizzati come esche per veicolare una tossina letale. e-BAT è infatti legato a una tossina batterica

Tabella 3 - Risultati ottenuti con l'immunoterapia.

Strategia	Nr cani	Criteri di inclusione	Outcome	Tossicità	Riferimento bibliografico
Cellule dendritiche autologhe	42	Solo splenici; Stadio II, dopo splenectomia	mST 203 giorni	Non descritta	152
Cellule dendritiche autologhe e interferone- α	8 (5 completano il trial)	Solo splenici; Stadio II-III, dopo splenectomia e contestualmente a doxorubicina low-dose	mST 109 giorni	Nessuna	153
Vaccino autologo a cellule intere	8 (7 a sede splenica)	Soprattutto sede splenica; Stadio III, dopo chirurgia	mST 142 giorni	Nessuna	154
Vaccino peptidico eterologo	28 (16 a sede splenica)	Tutte le sedi biologicamente aggressive; Stadio II, dopo chirurgia e contestualmente a doxorubicina	mTTP 195 giorni (266 giorni per la sede splenica); mST 276 giorni (269 giorni per la sede splenica)	Nessuna legata al vaccino	155
Lisati di cellule tumorali allogeniche e complessi liposomi-DNA	28 (21 a sede splenica di cui 17 in stadio II)	Tutte le sedi biologicamente aggressive; Stadio I-III, dopo chirurgia e contestualmente a doxorubicina	Per HSA splenici in stadio II, mTTP 146 giorni, mST 182 giorni	Tossicità gastroenterica di grado 1-2	156
Immunocidina	18 (11 completano il trial)	Solo splenici; Stadio II-III; dopo splenectomia e contestualmente a doxorubicina	mST 147 giorni	Letargia, diarrea; trombocitopenia e anemia di grado 5 in un cane	157

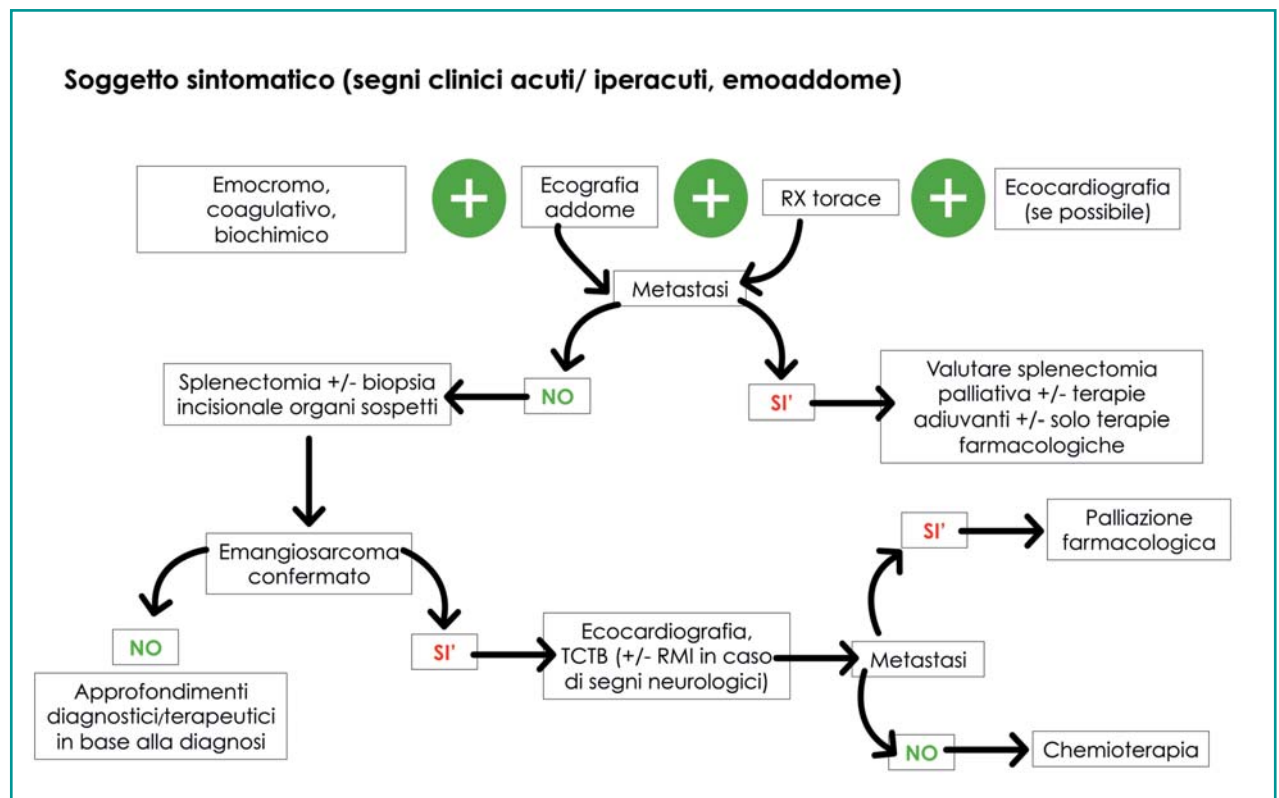
HSA: emangiosarcoma; mTTP: tempo mediano a progressione; mST: sopravvivenza mediana.



letale, geneticamente modificata per ridurne l'immuno-genicità nel paziente, che viene veicolata al tumore con alta specificità grazie alle due esche che costituiscono il farmaco. La proprietà unica di e-BAT è la sua capacità di alterare il microambiente tumorale, rendendolo osti-

le alle cellule tumorali.

Fino ad oggi, sono stati pubblicati i risultati di due stu-di clinici che hanno valutato l'uso di e-BAT in combi-nazione con il trattamento standard per l'emangiosar-coma splenico nei cani, comprendente chirurgia e do-



xorubicina adiuvante.

Nel primo studio, una singola somministrazione di e-BAT dopo chirurgia, seguita da 5 cicli di doxorubicina, ha determinato in 23 cani con emangiosarcoma splenico in stadio I-II una sopravvivenza a 6 mesi pari al 70%.¹⁵⁸ In uno studio successivo, e-BAT è stato somministrato in cicli ripetuti, iniziati una settimana prima della chemioterapia con doxorubicina, a 25 cani con emangiosarcoma in stadio I-III. È stata riscontrata una maggiore tossicità e una minore efficacia rispetto al singolo ciclo somministrato tra la splenectomia e l'inizio ritardato della chemioterapia.¹⁶¹

3) Propranololo in combinazione con la chemioterapia tradizionale

Il propranololo, un antagonista β -adrenergico non selettivo, comunemente usato per trattare le malattie cardiache, rappresenta una terapia adiuvante promettente, soprattutto nei tumori caratterizzati da una forte componente adrenergica e angiogenica.¹⁶² Questo farmaco si è dimostrato efficace nel ridurre la progressione della malattia e aumentare il tempo di sopravvivenza in pazienti umani con angiosarcoma,¹⁶² e di indurre remissioni nei neonati con angiomi benigni.¹⁶²

Il principale meccanismo d'azione del propranololo si traduce nell'inibizione dei recettori β -adrenergici presenti sulle cellule tumorali, sui linfociti T, sui macrofagi e sulle cellule endoteliali, riducendo l'effetto dell'epinefrina e della norepinefrina, che promuovono crescita, invasività e metastasi.¹⁶¹ Gli effetti che derivano da tale legame includono:

- Riduzione della proliferazione e della migrazione delle cellule endoteliali*, ostacolando i meccanismi che favoriscono la disseminazione metastatica.
- Modulazione del sistema immunitario*, riducendo l'infiltrazione dei linfociti T regolatori (Tregs), che sopprimono l'immunità antitumorale. Aumenta inoltre l'attività dei linfociti T citotossici, migliorando la risposta immunitaria contro il tumore.
- Regolazione del metabolismo tumorale*, interferendo con vie metaboliche, come l'ipossia-inducibile (HIF-1 α), riducendo così l'adattamento tumorale a condizioni avverse.
- Inibizione dell'angiogenesi*, bloccando la produzione di fattori proangiogenici, come VEGF.
- Riduzione dell'infiammazione*, inibendo citochine proinfiammatorie (ad esempio, IL-6), diminuendo così l'attività ed il reclutamento dei macrofagi associati al tumore.

Se utilizzato in combinazione alla chemioterapia tradizionale, il propranololo è in grado di potenziarne gli effetti citotossici e di inibire i meccanismi associati alla chemioresistenza.¹⁶³

L'esempio più esplicativo riguarda la doxorubicina.¹⁶³ Es-

sendo lisosomotropa, la doxorubicina viene sequestrata all'interno dei lisosomi, limitando l'accessibilità del farmaco al target e promuovendo in questo modo la chemioresistenza. Il propranololo è parimenti lisosomotropo e quindi compete con la doxorubicina, rendendola più disponibile.

Le applicazioni cliniche sono ancora scarse, ma decisamente promettenti. In uno studio preliminare, il propranololo è stato integrato in un protocollo con doxorubicina in 5 cani con emangiosarcoma in stadio III.¹⁶⁴ In 4 dei 5 cani è stato ottenuto un beneficio clinico, consistente in una risposta completa, una risposta parziale e due malattie stabili. In due casi, alcune o tutte le lesioni metastatiche si sono ridotte. Non è stata documentata tossicità rilevante dalla combinazione.

Più recentemente, è stato condotto uno studio prospettico su 20 cani con emangiosarcoma splenico in stadio I o II, sottoposti a splenectomia seguita da trattamento farmacologico con doxorubicina e propranololo.¹⁷⁶ Tuttavia, il confronto con una popolazione storica di 40 cani con caratteristiche cliniche analoghe, trattati con sola doxorubicina adiuvante, non ha evidenziato un beneficio significativo in termini di sopravvivenza.¹⁷⁶

In un altro studio, 7 cani con emangiosarcoma cardiaco sono stati trattati con radioterapia ad intensità modulata, vinblastina e propranololo. Anche in questo studio, il profilo tossicologico della combinazione è stato favorevole.¹⁶⁵

4) Rapamicina

Nell'emangiosarcoma canino, la mutazione di PTEN porta all'attivazione persistente della via PI3K/Akt/mTOR, favorendo la sopravvivenza e proliferazione tumorale.^{34,166} Akt attiva mTORC1, ma viene a sua volta attivato da mTORC2, fondamentale per la sua piena funzionalità. Sebbene mTORC1 regoli il metabolismo cellulare, è mTORC2 a risultare più cruciale per la progressione dell'emangiosarcoma. Nelle cellule endoteliali normali, infatti, mTORC2 ha un'attivazione sostenuta, mentre quella di mTORC1 è transitoria.¹⁶⁷ Questi dati suggeriscono che mTORC2 possa essere un bersaglio terapeutico rilevante nella malattia.¹⁶⁶

La rapamicina, un inibitore di mTORC1, è un immunosoppressore con significative proprietà antitumorali, approvato per il trattamento di diverse neoplasie umane. Esistono alcuni studi preclinici sull'efficacia di rapamicina su linee cellulari di emangiosarcoma,^{168,169} mentre sono stati riportati solo casi aneddotici sull'efficacia della rapamicina nell'emangiosarcoma canino e in altri tipi di tumore. In questi ultimi, l'attività di rapamicina è risultata imprevedibile, proprio perché il target potrebbe non essere così rilevante. In uno studio recente è stato evidenziato un significativo prolungamento di sopravvivenza per i cani trattati con rapamicina in presenza di

mutazioni di PIK3CA o TP53.¹⁷⁵ Questo risultato potrebbe giustificare l'impiego della rapamicina come trattamento adiuvante nei cani con tali marcatori genetici, indipendentemente dall'utilizzo di altri farmaci all'interno del protocollo terapeutico.

Guidelines SIONCOV 2025 for the Management of Dogs with Splenic Hemangiosarcoma

Summary

The rapid advancement of scientific knowledge in the field of veterinary oncology, supported by an extensive body of literature, along with the need to align with international research standards and Good Clinical Practice guidelines, underscores the importance of developing updated, easily accessible, and evidence-based guidelines. With this in mind, a panel of experts has drafted and externally reviewed the present guidelines, which outline the approach to canine splenic hemangiosarcoma. This document is not intended to be permanent but rather reflects current medical knowledge and should always be adapted to the patient and the clinical context in which it is applied.

BIBLIOGRAFIA

- Dobson JM, Samuel S, Milstein H *et al.* Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice* 43:240-6, 2002.
- Dobson JM. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Veterinary Science* 2013:941275, 2013.
- Tonomura N, Elvers I, Thomas R *et al.* Genome-wide association study identifies shared risk loci common to two malignancies in golden retrievers. *PLoS Genetics* 11(2):e1004922, 2015.
- Batschinski K, Nobre A, Vargas-Mendez E *et al.* Canine visceral hemangiosarcoma treated with surgery alone or surgery and doxorubicin: 37 cases (2005-2014). *The Canadian Veterinary Journal* 59(9):967-972, 2018.
- Carnio A, Eleni C, Cocumelli C *et al.* Evaluation of intrinsic and extrinsic risk factors for dog visceral hemangiosarcoma: A retrospective case-control study register-based in Lazio region, Italy. *Preventive Veterinary Medicine* 181:105074, 2020.
- Grüntzig K, Graf R, Boo G *et al.* Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development. *Journal of Comparative Pathology* 155(2-3):156-170, 2016.
- Robinson KL, Bryan ME, Atkinson ES *et al.* Neutering is associated with developing hemangiosarcoma in dogs in the Veterinary Medical Database: An age and time-period matched case-control study (1964-2003). *The Canadian Veterinary Journal* 61(5):499-504, 2020.
- Schultheiss PC. A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 16(6):522-6, 2004.
- Ward H, Fox LE, Calderwood-Mays MB *et al.* Cutaneous hemangiosarcoma in 25 dogs: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 8(5):345-8, 1994.
- Hargis AM, Ihrke PJ, Spangler WL *et al.* A retrospective clinicopathologic study of 212 dogs with cutaneous hemangiomas and hemangiosarcomas. *Veterinary Pathology* 29(4):316-28, 1992.
- Szivek A, Burns RE, Gericota B *et al.* Clinical outcome in 94 cases of dermal haemangiosarcoma in dogs treated with surgical excision: 1993-2007*. *Veterinary and Comparative Oncology* 10(1):65-73, 2012.
- Margarito JM, Ginel PJ, Molleda JM *et al.* Haemangiosarcoma associated with leishmaniasis in three dogs. *The Veterinary Record* 134(3):66-7, 1994.
- Varanat M, Maggi RG, Linder KE *et al.* Molecular prevalence of Bartonella, Babesia, and hemotropic Mycoplasma sp. in dogs with splenic disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25(6):1284-91, 2011.
- Ware WA, Hopper DL. Cardiac tumors in dogs: 1982-1995. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13(2):95-103, 1999.
- Prymak C, McKee IJ, Goldschmidt MH *et al.* Epidemiologic, clinical, pathologic, and prognostic characteristics of splenic hemangiosarcoma and splenic hematoma in dogs: 217 cases (1985). *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 193(6):706-12. PMID: 3192450, 1988.
- Torres de la Riva G, Hart BL, Farver TB *et al.* Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in golden retrievers. *PLOS One* 8(2):e55937, 2013.
- Zink MC, Farhooody P, Elser SE *et al.* Evaluation of the risk and age of onset of cancer and behavioral disorders in gonadectomized Vizslas. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 2014 Feb 1;244(3):309-19.
- Torres de la Riva G, Hart BL, Farver TB *et al.* Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in golden retrievers. *PLoS One* 8(2):e55937, 2013.
- Zwida KH, Kutzler MA. Canine splenic hemangiosarcoma cells express and activate luteinizing hormone receptors in vitro. *American Journal of Veterinary Research* 83(12):ajvr.22.07.0120, 2022.
- Falk H, Herbert J, Crowley S *et al.* Epidemiology of hepatic angiosarcoma in the United States: 1964-1974. *Environmental Health Perspectives* 41:107-13, 1981.
- Hart LA, Thigpen AP, Hart BL *et al.* Assisting decision-making on age of neutering for German Short/Wirehaired Pointer, Mastiff, Newfoundland, Rhodesian Ridgeback, Siberian Husky: associated joint disorders, cancers, and urinary incontinence. *Frontiers in Veterinary Science* 11:1322276., 2024.
- Kim JH, Graef AJ, Dickerson EB *et al.* Pathobiology of Hemangiosarcoma in Dogs: Research Advances and Future Perspectives. *Veterinary Science* 2(4):388-405, 2015.
- Lamerato-Kozicki AR, Helm KM, Jubala CM *et al.* Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation. *Experimental Hematology* 34(7):870-8, 2006.
- Gorden BH, Kim JH, Sarver AL *et al.* Identification of three molecular and functional subtypes in canine hemangiosarcoma through gene expression profiling and progenitor cell characterization. *The American Journal of Pathology* 184(4):985-995, 2014.
- Tamburini BA, Phang TL, Fosmire SP *et al.* Gene expression profiling identifies inflammation and angiogenesis as distinguishing features of canine hemangiosarcoma. *BMC Cancer* 10:619, 2010.
- Wu K, Rodrigues L, Post G *et al.* Analyses of canine cancer mutations and treatment outcomes using real-world clinico-genomics data of 2119 dogs. *NPJ Precision Oncology* 7(1):8, 2023.
- Wong S, Ehrhart EJ, Stewart S *et al.* Genomic landscapes of canine splenic angiosarcoma (hemangiosarcoma) contain extensive heterogeneity within and between patients. *PLoS One* 17(7):e0264986, 2022.
- Alsaihati BA, Ho KL, Watson J *et al.* Canine tumor mutational burden is correlated with TP53 mutation across tumor types and breeds. *Nature Communications* 3;12(1):4670, 2021.
- Kim JH, Megquier K, Thomas R *et al.* Genomically Complex Human Angiosarcoma and Canine Hemangiosarcoma Establish Convergent Angiogenic Transcriptional Programs Driven by Novel Gene Fusions. *Molecular Cancer Research* 19(5):847-861, 2021.
- Wang G, Wu M, Durham AC *et al.* Molecular subtypes in canine hemangiosarcoma reveal similarities with human angiosarcoma. *PLoS One* 15(3):e0229728, 2020.
- Megquier K, Turner-Maier J, Swofford R *et al.* Comparative Genomics Reveals Shared Mutational Landscape in Canine Hemangiosarcoma and Human Angiosarcoma. *Molecular Cancer Research: MCR* 17(12):2410-2421, 2019.
- Wang G, Wu M, Maloneyhuss MA *et al.* Actionable mutations in ca-

- nine hemangiosarcoma. *PLoS One* 12(11):e0188667, 2017.
33. García-Iglesias MJ, Cuevas-Higuera JL, Bastida-Sáenz A *et al.* Immunohistochemical detection of p53 and pp53 Ser³⁹² in canine hemangiomas and hemangiosarcomas located in the skin. *BMC Veterinary Research* 16(1):239, 2020.
 34. Dickerson EB, Thomas R, Fosmire SP *et al.* Mutations of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 in canine hemangiosarcoma. *Veterinary Pathology* 42(5):618-32, 2005.
 35. Tamburini BA, Trapp S, Phang TL *et al.* Gene expression profiles of sporadic canine hemangiosarcoma are uniquely associated with breed. *PLoS One* 20;4(5):e5549, 2009.
 36. Choorapoikayil S, Kuiper RV, de Bruin A *et al.* Haploinsufficiency of the genes encoding the tumor suppressor Pten predisposes zebrafish to hemangiosarcoma. *Disease Models and Mechanisms* 5(2):241-7, 2012.
 37. Aupperle-Lellbach H, Grassinger JM, Floren A *et al.* Tumour incidence in dogs in Germany: A retrospective analysis of 109,616 histopathological diagnoses (2014-2019). *Journal of Comparative Pathology* 198:33-55, 2022.
 38. Stewart SD, Ehrhart EJ, Davies R *et al.* Prospective observational study of dogs with splenic mass rupture suggests potentially lower risk of malignancy and more favourable perioperative outcomes. *Veterinary and Comparative Oncology* 18(4):811-817, 2020.
 39. Johnson KA, Powers BE, Withrow SJ *et al.* Splenomegaly in dogs. Predictors of neoplasia and survival after splenectomy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 3(3):160-6, 1989.
 40. Cleveland MJ, Casale S. Incidence of malignancy and outcomes for dogs undergoing splenectomy for incidentally detected nonruptured splenic nodules or masses: 105 cases (2009-2013). *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 1;248(11):1267-73, 2016.
 41. Ziogaite B, Contreras ET, Horgan JE. Incidence of splenic malignancy and hemangiosarcoma in dogs undergoing splenectomy surgery at a surgical specialty clinic: 182 cases (2017-2021). *PLoS One* 19(12):e0314737, 2024.
 42. Davies O, Taylor AJ. Refining the «double two-thirds» rule: Genotype-based breed grouping and clinical presentation help predict the diagnosis of canine splenic mass lesions in 288 dogs. *Veterinary and Comparative Oncology* 18(4):548-558, 2020.
 43. Hammond TN, Pesillo-Crosby SA. Prevalence of hemangiosarcoma in anemic dogs with a splenic mass and hemoperitoneum requiring a transfusion: 71 cases (2003-2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 232:553-558, 2008.
 44. Mallinckrodt MJ, Gottfried SD. Mass-to-splenic volume ratio and splenic weight as a percentage of body weight in dogs with malignant and benign splenic masses: 65 cases (2007-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 15;239(10):1325-7, 2011.
 45. O'Byrne K, Hosgood G. Splenic mass diagnosis in dogs undergoing splenectomy according to breed size. *The Veterinary Record* 184(20):620, 2019.
 46. Corbin EE, Cavanaugh RP, Schwartz P *et al.* Splenomegaly in small-breed dogs: 45 cases (2005- 2011). *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 250:1148-1154, 2017.
 47. Fleming J, Giuffrida MA, Runge JJ. Anatomic site and etiology of hemorrhage in small versus large dogs with spontaneous hemoperitoneum. *Veterinary Surgery* 47(8):1031-1038, 2018.
 48. Fernandez S, Lang JM, Maritato KC. Evaluation of Nodular Splenic Lesions in 370 Small-Breed Dogs (<15 kg). *Journal of the American Animal Hospital Association* 55(4):201-209, 2019.
 49. Brown NO, Patnaik AK, MacEwen EG. Canine hemangiosarcoma: retrospective analysis of 104 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 186(1):56-8, 1985.
 50. Hart BL, Hart LA, Thigpen AP *et al.* Assisting Decision-Making on Age of Neutering for Mixed Breed Dogs of Five Weight Categories: Associated Joint Disorders and Cancers. *Frontiers in Veterinary Science* 7:472, 2020.
 51. Hillman A, Swafford B, Delavenne C *et al.* Descriptive analysis of haemangiosarcoma occurrence in dogs enrolled in the Golden Retriever lifetime study. *Veterinary and Comparative Oncology* 21(4):700-708, 2023.
 52. Sherwood JM, Haynes AM, Klocke E *et al.* Occurrence and Clinicopathologic Features of Splenic Neoplasia Based on Body Weight: 325 Dogs (2003-2013). *Journal of the American Animal Hospital Association* 52(4):220-6, 2016.
 53. Mullin C, Clifford CA. Miscellaneous tumours: Hemangiosarcoma. In: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed.; Maryland Heights: Elsevier Saunders, 2020; pp. 773-778.
 54. Griffin MA, Culp WTN, Rebhun RB. Canine and feline haemangiosarcoma. *Veterinary Records* 585, e585, 2021.
 55. Story AL, Wavreille V, Abrams B *et al.* Outcomes of 43 small breed dogs treated for splenic hemangiosarcoma. *Veterinary Surgery* 49: 1154-1163, 2020.
 56. Panissidi AA, DeSandre-Robinson DM. Development of perioperative premature ventricular contractions as an indicator of splenic hemangiosarcoma and median survival times. *Veterinary Surgery* 50: 1609-1616, 2020.
 57. Boston SE, Higgison, G, Monteith G. Concurrent Splenic and Right Atrial Mass at Presentation in Dogs with HAS: A Retrospective Study. *Journal of the American Animal Hospital Association* 47: 336-341, 2011.
 58. Carloni A, Terragni R, Morselli-Labate AM *et al.* Prevalence, distribution, and clinical characteristics of hemangiosarcoma-associated skeletal muscle metastases in 61 dogs: A whole body computed tomographic study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33:812-819, 2019.
 59. Warry E, Bohn A, Emanuelli M *et al.* Disease distribution in canine patients with acanthocytosis: 123 cases. *Veterinary Clinical Pathology* 42/4. 465-470, 2013.
 60. Hirsch VM, Jacobsen J, Millis JHL. A retrospective study of canine hemangiosarcoma and its association with acanthocytosis. *The Canadian Veterinary Journal* 22: 152-155, 1981.
 61. Hammer AS, Couto CG, Swardson C *et al.* Hemostatic abnormalities in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 511-14, 1991.
 62. Stockham SL, Scott MA. Chapter 3: erythrocytes. In: *Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology* 3rd ed, Wiley, 2024, pp. 173-174.
 63. Stockham SL, Scott MA. Chapter 19: peritoneal, pleural and pericardial effusions. In: *Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology* 3rd edition, Wiley, 2024, pp. 1119-1120; 1157-1158.
 64. Hargis AM, Feldman BF. Evaluation of hemostatic defects secondary to vascular tumors in dogs: 11 cases (1983-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198, 891-894, 1991.
 65. Witter LE, Gruber EJ, Lean FZX *et al.* Evaluation of procoagulant tissue factor expression in canine hemangiosarcoma cell lines. *American Journal Veterinary Research* Vol 78, 2017.
 66. Suphonkhan J, Klaymongkol C, Khomsiri W *et al.* Retrospective study of clinicopathological changes and prediction model for canine vascular neoplasms. *Veterinary Science*. 11, 189, 2024.
 67. Heishima K, Ichikawa Y, Yoshida K *et al.* Circulating microRNA-214 and -126 as potential biomarkers for canine neoplastic disease. *Scientific Reports* 7(1):2301, 2017.
 68. Grimes JA, Prasad N, Levy S *et al.* A comparison of microRNA expression profiles from splenic hemangiosarcoma, splenic nodular hyperplasia, and normal spleens of dogs. *BMC Veterinary Research* 12(1):272, 2016.
 69. Grimes JA, Robinson KR, Bullington AM *et al.* Identification of serum microRNAs with differential expression between dogs with splenic masses and healthy dogs with histologically normal spleens. *American Journal of Veterinary Research* 82(8):659-666, 2021.
 70. Schwarzenbach H. The clinical relevance of circulating, exosomal miRNAs as biomarkers for cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostic* 15(9):1159-69, 2015.
 71. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 29;105(30):10513-8, 2008.
 72. Chen X, Ba Y, Ma L *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* 18(10):997-1006, 2008.
 73. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 87:3-14, 2015.

74. Heishima K, Mori T, Sakai H *et al.* MicroRNA-214 Promotes Apoptosis in Canine Hemangiosarcoma by Targeting the COP1-p53 Axis. *PLoS One* 3;10(9):e0137361, 2015.
75. Ludwig L, Treleaven H, Khachadoorian A *et al.* MicroRNAs in serum and tissue can differentiate splenic hemangiosarcoma from other splenic masses in dogs. *Veterinary Pathology* 19:3009858251317466, 2025.
76. Meazzi S, Martini V, Marconato L *et al.* Circulating nucleosomes as a potential cancer biomarker in dogs with splenic nodular lesions. *Veterinary Quarterly*. 44, 1: 1-7, 2024.
77. Wilson-Robles H, Miller T, Jarvis J *et al.* Characterizing circulating nucleosomes in the plasma of dogs with hemangiosarcoma. *BMC Veterinary Research*. 17:231, 2021.
78. Moon Larson. Liver and spleen. In: Thrall's Textbook of veterinary diagnostic radiology, 8th ed, Elsevier 2025, pp 805-836.
79. Hecht S. Spleen. In: Penninck D, d'Anjou MA, eds. Atlas of Small Animal Ultrasonography. 2nd ed. Ames, IA: Blackwell 2015, pp 239-258.
80. Wrigley RH, Park RD, Konde LJ *et al.* Ultrasonographic features of splenic hemangiosarcoma in dogs: 18 cases (1980 e 1986). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192(8); 1113e1117, 1988.
81. Sharpley JL, Marolf AJ, Reichle JK *et al.* Color and power Doppler ultrasonography for characterization of splenic masses in dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 53(5):586-90, 2012.
82. Cuccovillo A, Lamb CR. Cellular features of sonographic target lesions of the liver and spleen in 21 dogs and a cat. *Veterinary radiology & ultrasound* 43(3):275-8, 2002.
83. Ivanci M, Long F, Seiler GS. Contrast harmonic ultrasonography of splenic masses and associated liver nodules in dogs *Journal of the American Veterinary Medical Association* 234(1):88-94, 2009.
84. Fife WD, Samii VD, Drost WD *et al.* Comparison between malignant and nonmalignant splenic masses in dogs using contrast-enhanced computed tomography. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 45(4), 289-297, 2004.
85. Kutara K, Seki M, Ishigaki K. Triple-phase helical computed tomography in dogs with solid splenic masses. *The Journal of Veterinary Medical Science* 79(11):1870-1877, 2017.
86. Holter DL, Nafe LA, Dugat DR *et al.* *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2023 Oct;87(4):265-271
87. Ballegeer EA, Forrest LJ, Dickinson RM *et al.* Correlation of ultrasonographic appearance of lesions and cytologic and histologic diagnoses in splenic aspirates from dogs and cats: 32 cases (2002-2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 230(5):690-6, 2007.
88. Tecilla M, Gambini M, Forlani A *et al.* Evaluation of cytological diagnostic accuracy for canine splenic neoplasms: An investigation in 78 cases using STARD guidelines. *PLoS One* 14(11):e0224945, 2019.
89. Yankin I, Nemanic S, Funes S *et al.* Clinical relevance of splenic nodules or heterogeneous splenic parenchyma assessed by cytologic evaluation of fine-needle samples in 125 dogs (2011-2015). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 34(1):125-131, 2020.
90. O'Keefe DA, Couto CG. Fine-needle aspiration of the spleen as an aid in the diagnosis of splenomegaly. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1(3):102-9, 1097.
91. Hammer AS, Bailey MQ, Sagartz JE. Retrospective assessment of thoracic radiographic findings in metastatic canine haemangiosarcoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 34(4):235-238, 2005.
92. Holt D, Van Winkle T, Schelling C *et al.* Correlation between thoracic radiographs and postmortem findings in dogs with hemangiosarcoma: 77 cases (1984-1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200; 1535-1539, 1992.
93. Warren-Smith CM, Andrew S, Mantis P *et al.* Lack of associations between ultrasonographic appearance of parenchymal lesions of the canine liver and histological diagnosis. *Journal of Small Animal Practice* 53(3):168e173, 2012.
94. Ramirez AR, Stewart SD, Khanna C. Ultrasonographic liver nodules are more often benign lesions in dogs with hemoperitoneum secondary to splenic tumor rupture. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 7;262(11):1499-1503, 2024.
95. Brown D, Gaillot H, Cunningham S. Heart. In: Penninck D, d'Anjou MA, eds. Atlas of Small Animal Ultrasonography. 2nd ed. Ames, IA: Blackwell; 2015.
96. Armbrust LJ, Biller DS, Bamford A *et al.* Comparison of three-view thoracic radiography and computed tomography for the detection of pulmonary nodules in dogs with neoplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 240(9):1088-94, 2012.
97. Mattolini M, Citi S, Franchi R *et al.* Computed tomographic features of pulmonary and extrapulmonary lesions can be useful in prioritizing the diagnosis of hemangiosarcoma metastases in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 3;85(12), 2024.
98. Kim J, Lee S, Hwang J *et al.* Clinical utility of a new protocol of cardiac computed tomography in dogs. *Veterinary Medicine and Science* 9(2):645-652, 2023.
99. Clifford CA, Pretorius ES, Weisse C *et al.* Magnetic resonance imaging of focal splenic and hepatic lesions in the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 18(3):330-8, 2004.
100. Kim M, Choi S, Choi H *et al.* Diagnosis of a large splenic tumor in a dog: computed tomography versus magnetic resonance imaging. *The Journal of Veterinary Medical Science* 77(12):1685-7, 2016.
101. Song RB, Vite CH, Bradley CW *et al.* Postmortem evaluation of 435 cases of intracranial neoplasia in dogs and relationship of neoplasm with breed, age, and body weight. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27(5):1143-52, 2013.
102. Wisner ER, Dickinson PJ, Higgins RJ. Magnetic resonance imaging features of canine intracranial neoplasia. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 52 (1 Suppl 1):S52-61, 2011.
103. Bertazzolo W, Dell'Orco M, Bonfanti U *et al.* Canine angiosarcoma: cytologic, histologic, and immunohistochemical correlations. *Veterinary Clinical Pathology* 34(1):28-34, 2005.
104. Roccabianca P, Schulman SY, Avallone G *et al.* In: *Surgical pathology of tumors of domestic animals, Vol. 3: Tumors of soft tissue*. Ed. M Kiupel. Gurnee, Davis-Thompson Foundation, 2020, pp 169-180.
105. Patten SG, Boston SE, Monteith GJ. Outcome and prognostic factors for dogs with a histological diagnosis of splenic hematoma following splenectomy: 35 cases (2001-2013). *The Canadian Veterinary Journal* 57(8):842-6, 2016.
106. Millar SL, Curley TL, Monnet EL *et al.* Premature death in dogs with nontraumatic hemoabdomen and splenectomy with benign histopathologic findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 260(S1):S9-S14, 2021.
107. Herman EJ, Stern AW, Fox RJ *et al.* Understanding the Efficiency of Splenic Hemangiosarcoma Diagnosis Using Monte Carlo Simulations. *Veterinary Pathology* 56(6):856-859, 2019.
108. De Nardi AB, de Oliveira Massoco Salles Gomes C, Fonseca-Alves CE *et al.* Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Canine Hemangiosarcoma: A Review Based on a Consensus Organized by the Brazilian Association of Veterinary Oncology, ABROVET. *Cancers (Basel)* 15(7):2025, 2023.
109. Barrantes Murillo DF, Negrão Watanabe TT, Wiener DJ *et al.* Cytokeratin AE1/AE3 immunolabeling in epithelioid hemangiosarcoma. *Veterinary Pathology* 62(1):42-47, 2025.
110. Brigandi E, Valenti P, Bacci B *et al.* Prognostic impact of Ki-67 in canine splenic hemangiosarcoma: A preliminary study. *Veterinary Pathology* 61(4):534-540, 2024.
111. Wendelburg KM, O'Toole TO, McCobb E *et al.* Risk factors for perioperative death in dogs undergoing splenectomy for splenic masses: 539 cases (2001-2012). *Journal of American Veterinary Medical Association* 15;245(12):1382-90, 2014.
112. Menard JV, Sylvester SR, Lopez DJ. Assessing major influences on decision-making and outcome for dogs presenting emergently with non-traumatic hemoabdomen. *Journal of American Veterinary Medical Association* 28;261(7):980-988, 2023.
113. Clendaniel DC, Sivacolundhu RK, Sorenmo KU *et al.* Association between macroscopic appearance of liver lesions and liver histology in dogs with splenic hemangiosarcoma: 79 cases (2004-2009). *Journal of American Animal Hospital Association* 50:e6-e10, 2014.
114. Hosgood G, Bone DL, Vorhees WD 3rd *et al.* Splenectomy in the dog by ligation of the splenic and short gastric arteries. *Veterinary Surgery* 18(2):110-3, 1989.
115. Rivier P, Monnet E. Use of a vessel sealant device for splenectomy in dogs. *Veterinary Surgery* 40:102-105, 2011.
116. Monarski CJ, Jaffe MH, Kass PH. Decreased surgical time with a ves-

- sel sealing device versus a surgical stapler in performance of canine splenectomy. *Journal of American Animal Hospital Association* 50:42-45, 2014.
117. Sirochman AL, Milovancev M, Townsend K *et al.* Influence of use of a bipolar vessel sealing device on short-term postoperative mortality after splenectomy: 203 dogs (2005-2018). *Veterinary Surgery* 49(2):291-303, 2020.
 118. Collard F, Nadeau M, Carmel E. Laparoscopic splenectomy for treatment of splenic hemangiosarcoma in a dog. *Veterinary Surgery* 39: 870-872, 2010.
 119. Shaver SL, Mayhew PD, Steffey MA *et al.* Short-term outcome of multiple port laparoscopic splenectomy in 10 dogs. *Veterinary Surgery* 99:1-5, 2014.
 120. Mayhew PD, Sutton JS, Singh A *et al.* Complications and short-term outcomes associated with single-port laparoscopic splenectomy in dogs. *Veterinary Surgery* 47(S1):O67-O74, 2018.
 121. Stedile R, Beck CA, Schiochet F *et al.* Laparoscopic versus open splenectomy in dogs. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 29(8):653-660, 2009.
 122. McGaffey MES, Singh A, Buote NJ *et al.* Complications and outcomes associated with laparoscopic-assisted splenectomy in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 260(11):1309-1315, 2022.
 123. Wright T, Singh A, Mayhew PD *et al.* Laparoscopic-assisted splenectomy in dogs: 18 cases (2012-2014). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 248(8):916-22, 2016.
 124. Phipps WE, de Laforcade AM, Barton BA *et al.* Postoperative thrombocytosis and thromboelastographic evidence of hypercoagulability in dogs undergoing splenectomy for splenic masses. *Journal of American Veterinary Medical Association* 256:85-92, 2020.
 125. Lynch AM, O'Toole T, Hamilton J. Transfusion practices for treatment of dogs undergoing splenectomy for splenic masses: 542 cases (2001-2012). *Journal of American Veterinary Medical Association* 247:636-642, 2015.
 126. Clifford CA, Mackin AJ, Henry CJ. Treatment of Canine Hemangiosarcoma: 2000 and beyond. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14: 479-485, 2000.
 127. Kim, SE, Liptak JM, Gall TT *et al.* Epirubicin in the adjuvant treatment of splenic hemangiosarcoma in dogs: 59 cases (1997-2004). *Journal of American Veterinary Medical Association* 231:1550-1557, 2007.
 128. Sorenmo K, Samluk M, Clifford C *et al.* Clinical and pharmacokinetic characteristics of intracavitary administration of pegylated liposomal encapsulated doxorubicin in dogs with splenic hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21:1347-1354, 2007.
 129. Wendelburg KM, Price LL, Burgess KE *et al.* Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001-2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 247: 393-403, 2015.
 130. Faroni E, Sabattini S, Guerra D *et al.* Timely adjuvant chemotherapy improves outcome in dogs with non-metastatic splenic hemangiosarcoma undergoing splenectomy. *Veterinary and Comparative Oncology* 21: 123-130, 2023.
 131. Rassnick KM, Frimberger AE, Wood CA *et al.* Evaluation of ifosfamide for treatment of various canine neoplasms. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14: 271-276, 2000.
 132. Payne SE, Rassnick KM, Northrup NC *et al.* Treatment of vascular and soft-tissue sarcomas in dogs using an alternating protocol of ifosfamide and doxorubicin. *Veterinary and Comparative Oncology* 1: 171-179, 2003.
 133. Sorenmo KU, Baez JL, Clifford CA *et al.* Efficacy and toxicity of a dose-intensified doxorubicin protocol in canine hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18: 209-213, 2004.
 134. Matsuyama A, Poirier VJ, Mantovani F *et al.* Adjuvant Doxorubicin with or without Metronomic Cyclophosphamide for Canine Splenic Hemangiosarcoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* 53: 304-312, 2017.
 135. Moore AS, Rassnick KM, Frimberger AE. Evaluation of clinical and histologic factors associated with survival time in dogs with stage II splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy and adjuvant chemotherapy: 30 cases (2011-2014). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 251: 559-565, 2017.
 136. Treggiari E, Borrego JF, Gramer I *et al.* Retrospective comparison of first-line adjuvant anthracycline vs metronomic-based chemotherapy protocols in the treatment of stage I and II canine splenic haemangiosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 18: 43-51, 2020.
 137. Teske E, Rutteman GR, Kirpenstein J *et al.* A randomized controlled study into the efficacy and toxicity of pegylated liposome encapsulated doxorubicin as an adjuvant therapy in dogs with splenic haemangiosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 9:283-289, 2001.
 138. Faulhaber EA, Janik E, Thamm DH. Adjuvant carboplatin for treatment of splenic hemangiosarcoma in dogs: Retrospective evaluation of 18 cases (2011-2016) and comparison with doxorubicin-based chemotherapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 35: 1929-1934, 2021.
 139. Kahn SA, Mullin CM, de Lorimier LP *et al.* Doxorubicin and deracoxib adjuvant therapy for canine splenic hemangiosarcoma: a pilot study. *The Canadian Veterinary Journal* 54: 237-242, 2013.
 140. Finotello R, Stefanello D, Zini E *et al.* Comparison of doxorubicin-cyclophosphamide with doxorubicin-dacarbazine for the adjuvant treatment of canine hemangiosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 15: 25-35, 2017.
 141. Lana S, U'ren L, Plaza S *et al.* Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic hemangiosarcoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21: 764-769, 2007.
 142. Alexander CK, Cronin KL, Silver M *et al.* The addition of metronomic chemotherapy does not improve outcome for canine splenic haemangiosarcoma. *Journal of Small Animal Practice* 60: 32-37, 2019.
 143. Finotello R, Henriques J, Sabattini S *et al.* A retrospective analysis of chemotherapy switch suggests improved outcome in surgically removed, biologically aggressive canine haemangiosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 15: 493-503, 2017b.
 144. Bray JP, Orbell G, Cave N *et al.* Does thalidomide prolong survival in dogs with splenic haemangiosarcoma? *Journal of Small Animal Practice* 59:85-91, 2018.
 145. Gardner HL, London CA, Portela RA *et al.* Maintenance therapy with toceranib following doxorubicin-based chemotherapy for canine splenic hemangiosarcoma. *BMC Veterinary Research* 11:131, 2015.
 146. Sorenmo K, Duda L, Barber L *et al.* Canine hemangiosarcoma treated with standard chemotherapy and minocycline. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14: 395-398, 2000.
 147. Dervisis NG, Dominguez PA, Newman RG *et al.* Treatment with DAV for advanced-stage hemangiosarcoma in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 47: 170-178, 2011.
 148. Alvarez FJ, Hosoya K, Lara-Garcia A *et al.* VAC protocol for treatment of dogs with stage III hemangiosarcoma. *Journal of the American Animal Hospital Association* 49: 370-377, 2013.
 149. Marconato L, Chalfon C, Finotello R *et al.* Adjuvant anthracycline-based vs metronomic chemotherapy vs no medical treatment for dogs with metastatic splenic hemangiosarcoma: A multi-institutional retrospective study of the Italian Society of Veterinary Oncology. *Veterinary and Comparative Oncology* 17: 537-544, 2019.
 150. Hammer AS, Couto CG, Filippi J *et al.* Efficacy and toxicity of VAC chemotherapy (vincristine, doxorubicin, and cyclophosphamide) in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 5: 160-166, 1991.
 151. Ogilvie GK, Powers BE, Mallinckrodt CH *et al.* Surgery and doxorubicin in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10: 379-384, 1986.
 152. Spiller V, Vetter M, Dettmer-Richardt C *et al.* Prospective study of successful autologous dendritic cell therapy in dogs with splenic stage II hemangiosarcoma. *Veterinary Journal* 306:106196, 2024.
 153. Konduri V, Halpert MM, Baig YC *et al.* Dendritic cell vaccination plus low-dose doxorubicin for the treatment of spontaneous canine hemangiosarcoma. *Cancer Gene Therapy* 26(9-10):282-291, 2019.
 154. Lucroy MD, Clauson RM, Suckow MA *et al.* Evaluation of an autologous cancer vaccine for the treatment of metastatic canine hemangiosarcoma: a preliminary study. *BMC Veterinary Research* 16(1):447, 2020.
 155. Marconato L, Tiraboschi L, Aralla M *et al.* A Phase 2, Single-Arm, Open-Label Clinical Trial on Adjuvant Peptide-Based Vaccination in Dogs with Aggressive Hemangiosarcoma Undergoing Surgery and Chemotherapy. *Cancers (Basel)* 15(17):4209, 2023.

156. U'Ren LW, Biller BJ, Elmslie RE *et al.* Evaluation of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21(1):113-20, 2007.
157. Musser ML, Coto GM, Lingnan Y *et al.* Pilot safety evaluation of doxorubicin chemotherapy combined with non-specific immunotherapy (Immunocidin®) for canine splenic hemangiosarcoma. *PLoS One* 17(12):e0279594, 2022.
158. Borgatti A, Koopmeiners JS, Sarver AL *et al.* Safe and Effective Sarcoma Therapy through Bispecific Targeting of EGFR and uPAR. *Molecular Cancer Therapeutics* 16(5):956-965, 2017.
159. Borgatti A, Fieberg A, Winter AL *et al.* Impact of repeated cycles of EGF bispecific angiotoxin (eBAT) administered at a reduced interval from doxorubicin chemotherapy in dogs with splenic haemangiosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 18(4):664-674, 2020.
160. Dickerson EB, Bryan BA. Beta Adrenergic Signaling: A Targetable Regulator of Angiosarcoma and Hemangiosarcoma. *Veterinary Sciences* 2(3):270-292, 2015.
161. Wagner MJ, Cranmer LD, Loggers ET *et al.* Propranolol for the treatment of vascular sarcomas. *Journal of Experimental Pharmacology* 6;10:51-58, 2018.
162. Kum JJ, Khan ZA. Mechanisms of propranolol action in infantile hemangioma. *Dermatoendocrinology* 6(1):e979699, 2015.
163. Saha J, Kim JH, Amaya CN *et al.* Propranolol Sensitizes Vascular Sarcoma Cells to Doxorubicin by Altering Lysosomal Drug Sequestration and Drug Efflux. *Frontiers in Oncology* 1;10:614288, 2021.
164. Terauchi M, Fujii Y, Goto S *et al.* Efficacy and adverse events of anthracycline and propranolol combination in five dogs with stage 3 hemangiosarcoma. *Open Veterinary Journal* 13(6):801-806, 2023.
165. Moirano S, Turek M, Sanchez D *et al.* Intensity-modulated radiotherapy and chemotherapy for canine right atrial tumors: A retrospective study of seven dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 64(6):1099-1102, 2023.
166. Murai A, Abou Asa S, Kodama A *et al.* Immunohistochemical analysis of the Akt/mTOR/4E-BP1 signalling pathway in canine haemangiomas and haemangiosarcomas. *Journal of Comparative Pathology* 147(4):430-40, 2012.
167. Li W, Petrimpol M, Molle KD *et al.* Hypoxia-induced endothelial proliferation requires both mTORC1 and mTORC2. *Circulation Research* 100(1):79-87, 2007.
168. Adachi M, Hoshino Y, Izumi Y *et al.* Effects of inhibitors of vascular endothelial growth factor receptor 2 and downstream pathways of receptor tyrosine kinases involving phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin or mitogen-activated protein kinase in canine hemangiosarcoma cell lines. *Canadian Journal of Veterinary Research* 80(3):209-16, 2016.
169. Andersen NJ, Boguslawski EB, Kuk CY *et al.* Combined inhibition of MEK and mTOR has a synergic effect on angiosarcoma tumorgrafts. *International Journal of Oncology* 47(1):71-80, 2015.
170. Ruffoni E, Stewart S, Khanna C *et al.* A prospective observational study of 345 canines with ruptured splenic tumors suggests benign lesions are more common than previously reported. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 7:1-6, 2025.
171. Kelsey J, Balfour R, Szabo D *et al.* Prognostic value of sternal lymphadenopathy on malignancy and survival in dogs undergoing splenectomy. *Veterinary and Comparative Oncology* 20(1):1-7, 2022.
172. Clarke E, Levien AS, Bennett RA *et al.* Clinical utility of liver biopsies in dogs undergoing splenectomy. *Journal of Small Animal Practice* 2020;61(11):684-688.
173. Okonji S, Rossi F, Sabattini S *et al.* Brain Metastases from Solid Cancers in 58 Dogs. *Veterinary Medicine and Science* 2025;11(4):e70441.
174. Borgatti A, Winter AL, Stuebner K *et al.* Evaluation of 18-F-fluoro-2-deoxyglucose (FDG) positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) as a staging and monitoring tool for dogs with stage-2 splenic hemangiosarcoma - A pilot study. *PLoS One* 2017;12(2):e0172651.
175. Rodrigues L, Wu K, Harvey G *et al.* Real-world evidence couples genomic biomarkers with therapeutic outcomes for canine hemangiosarcoma. *Sci Rep.* 2025;15(1):16442.
176. Borgatti A, Husbands BD, Sarver AL *et al.* Younger Age Is Associated with Favorable Outcomes in Adult Dogs with Hemangiosarcoma Receiving Adjuvant Doxorubicin Chemotherapy: Results from the PRODOX Study. *Res Sq.* 2025 5:rs.3.rs-6573099.