

Linee guida SIONCOV 2022 per il trattamento e la diagnosi istopatologica del mastocitoma cutaneo e sottocutaneo del cane



L'impetuosa acquisizione di informazioni che deriva dalla florida letteratura e l'obiettivo di allineamento agli standard internazionali della ricerca in campo dell'oncologia veterinaria e di aderenza alle norme di Buona Pratica Clinica esigono la formulazione di linee guida aggiornate, di facile consultazione e che riflettano le migliori evidenze scientifiche pubblicate disponibili. In quest'ottica sono state redatte da un Panel di Esperti e revisionate da Revisori Esterni le linee guida da seguire per il trattamento e la diagnosi istopatologica del mastocitoma cutaneo e sottocutaneo del cane. Il documento non è da intendersi come permanente, riflettendo le conoscenze mediche attuali.

PRESENTAZIONE DEL DOCUMENTO

L'impetuosa acquisizione di informazioni che deriva dalla florida letteratura e l'obiettivo di allineamento agli standard internazionali della ricerca in campo dell'oncologia veterinaria e di aderenza alle norme di Buona Pratica Clinica esigono un aggiornamento delle linee guida sulla gestione del più comune tumore maligno cutaneo del cane, il mastocitoma.

Le incertezze in medicina nascono generalmente dalla mancanza di studi appropriati su specifici argomenti, che esita nella non ottimale gestione del paziente, con possibili risvolti etici e/o legali.

Dopo 10 anni dalla prima pubblicazione del Consenso

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

Roberta Ferrari, Med Vet, PhD

Federica Rossi, Med Vet, SRV, DECVDI

Donatella De Zani, Med Vet, PhD

Silvia Sabattini, Med Vet, PhD, DECVP

Davide Berlato, Med Vet, PhD, DECVIM-CA (Oncology),
(add Rad Onc) MSc (Clin Onc) MRCVS

Maria Amati, Med Vet, Master oncologia secondo livello.

Marina Martano, Med Vet, PhD, Professore Ordinario

Maurizio Annoni, Med Vet

Selina Iussich, Med Vet, post grad. spec. Scienza e
Medicina degli Animali da Laboratorio, Professore
Associato

Giuliano Bettini, Med Vet, Professore Ordinario

Damiano Stefanello, Med Vet, PhD, Professore Ordinario

Europeo sulla gestione del mastocitoma del cane e del gatto,¹ la Società Italiana di Oncologia Veterinaria (SIONCOV) ha ritenuto indispensabile farsi promotrice della stesura di linee guida aggiornate.

Il 20 e 21 novembre 2021 il Consiglio Direttivo ed i membri della SIONCOV si sono riuniti in una tavola rotonda per definire, sulla base della revisione critica delle evidenze scientifiche attualmente disponibili, linee guida che dettino le indagini necessarie per stadiale e trattare il mastocitoma cutaneo e sottocutaneo del cane, sintetizzando ciò che è attualmente conosciuto e affrontando le incertezze con comportamenti di buona pratica clinica. Alla

*Corresponding author: laura.marconato@unibo.it

Ricevuto: 04/07/2022 - Accettato: 12/09/2022

tavola rotonda hanno partecipato anche alcuni Esperti, ed altri Esperti 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, un gruppo di lavoro ristretto ha provveduto ad una prima stesura delle linee guida e delle raccomandazioni. Questa bozza è stata fatta circolare tra i membri del Panel e sottoposta a revisori esterni per eventuali commenti.

Le raccomandazioni contenute in questo documento sono presentate in forma sintetica e schematica che ne renda facile la consultazione; esse riflettono le migliori evidenze scientifiche pubblicate 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. Poiché le conoscenze scientifiche sono in continua evoluzione, la decisione di attenersi rigorosamente alle raccomandazioni proposte va sempre rapportata al singolo caso, pur tenendo in considerazione la reale necessità di deroga.

Il presente documento, suddiviso in due parti (stadiazione e terapia) si propone come strumento di lavoro attivo e di supporto per fornire raccomandazioni basate sull'evidenza per la gestione del mastocitoma cutaneo e sottocutaneo 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, Bologna, Italia

Panel:

Maria Amati - Oncologia Medica - Clinica Veterinaria Oltrepo Pavese, Stradella (PV), Italia

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

Davide Berlato - Radioterapia e Oncologia Medica - AniCura Animal Oncology and Imaging Center, Hünenberg, Svizzera

Giuliano Bettini - Anatomia Patologica - Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Bologna, Italia

Donatella De Zani - Diagnostica per Immagini - Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Veterinarie, Milano, Italia

Roberta Ferrari - Chirurgia e Oncologia - Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Veterinarie, Milano, Italia

Selina Iussich - Anatomia Patologica - Dipartimento di Scienze Veterinarie, Torino, Italia

Laura Marconato - Oncologia Medica - Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Bologna, Italia

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

Federica Rossi - Diagnostica per Immagini - AniCura Clinica Veterinaria dell'Orologio, Bologna, Italia

Silvia Sabattini - Anatomia Patologica - Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Bologna, Italia

Damiano Stefanello - Chirurgia e Oncologia - Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Veterinarie, Milano, Italia

Revisori esterni:

Edoardo Auriemma - Diagnostica per Immagini - AniCura Istituto Veterinario di Novara, Novara, Italia

Walter Bertazzolo - Patologia Clinica - Laboratorio MY-LAV, Milano, Italia

Julia Buchholz - Radioterapia - Small Animal Clinic Hofheim, Germania

Paolo Buracco - Chirurgia Oncologica - Dipartimento di Scienze Veterinarie, Torino, Italia

Nicola Di Girolamo - Metodologia - Cornell University, USA

Riccardo Finotello - Oncologia medica - School of Veterinary Science, Università di Liverpool, Neston, Inghilterra

Paola Rocchbianca - Anatomia Patologica - Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Veterinarie, Milano, Italia

COME LEGGERE LE RACCOMANDAZIONI

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

La **valutazione della certezza dell'evidenza** è distinta in quattro livelli:

- 1) molto bassa, quando si basa sull'opinione degli esperti o indicazioni di comitati
- 2) bassa, quando si basa sulle conclusioni di studi osservazionali non analitici (case reports, serie di casi)
- 3) moderata, quando si basa sulle conclusioni di studi osservazionali analitici (coorte, caso-controllo, trasversali)
- 4) alta, quando si basa sulle conclusioni di trial clinici randomizzati o revisioni sistematiche con o senza meta-analisi

Pertanto, l'evidenza è alta se gli studi valutati hanno una probabilità più bassa di errore. Gli studi vengono assegnati a livelli inferiori al crescere delle probabilità di errore relativo al disegno e/o alla conduzione dello studio. Studi non analitici (come reports di casi o serie di casi) e opinioni degli esperti sono attribuiti ai livelli minimi.

La **forza della raccomandazione clinica** viene graduata in base all'importanza clinica su 4 livelli:

- 1) **positiva forte** (forte a favore), quando l'intervento in esame dovrebbe essere considerato come prima opzione (evidenza che i benefici sono prevalenti sui danni)
- 2) **positiva debole** (condizionata a favore), quando l'intervento in esame può essere considerato come opzione di prima intenzione, consapevoli dell'esistenza di alternative ugualmente proponibili (incertezza riguardo alla prevalenza dei benefici sui danni)
- 3) **negativa debole** (condizionata a sfavore), quando l'intervento in esame non dovrebbe essere considerato come opzione di prima intenzione; esso potrebbe comunque essere suscettibile di impiego in casi altamente selezionati (incertezza riguardo alla prevalenza dei danni sui benefici)
- 4) **negativa forte** (forte a sfavore), quando l'intervento in esame non deve essere in alcun caso preso in considerazione (evidenza che i danni sono prevalenti sui benefici).

Attraverso la valutazione critica e sistematica delle evidenze, le raccomandazioni cliniche offrono un bilancio di benefici ed effetti sfavorevoli tra opzioni alternative, rappresentando il punto di riferimento più importante per i medici veterinari ed i pazienti, 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 alta, la raccomandazione non è positiva forte, qualora esista, ad esempio, una reale incertezza sulla fattibilità e impatto della procedura.

TERAPIA CHIRURGICA

La terapia chirurgica, pianificata su una corretta stadiazione, gioca un ruolo fondamentale nel trattamento del mastocitoma cutaneo e sottocutaneo.

• Asportazione del tumore primitivo

In caso di mastocitomi di basso grado istologico, rimossi completamente e con linfonodi in stadio HN0 -

HN2, la sola rimozione chirurgica può essere considerata curativa.²⁻⁶ In caso di mastocitomi di alto grado istologico oppure con metastasi nodale conclamata (HN3), la chirurgia deve essere associata a chemioterapia adiuvante.⁷⁻¹⁰

In merito ai margini di escissione, mentre tutta la letteratura concorda sulla necessità di rimuovere almeno un piano fasciale profondo macroscopicamente non infiltrato dal tumore,^{6,11} ad oggi non sono forniti dati chiari su quale sia la dose chirurgica adeguata da applicare al margine laterale.

In linea generale, si consideri l'impiego della tecnica del margine proporzionale (mai inferiore a 5 mm), in presenza di mastocitomi senza caratteristiche cliniche o citologiche di aggressività e di diametro maggiore <2 cm;¹²⁻¹⁵ per tumori di dimensioni comprese tra 2 e 4 cm, invece, il margine deve essere di 2-3 cm.^{1,6,16}

In caso di mastocitomi con evidenti caratteristiche cliniche o citologiche di aggressività e/o con diametro maggiore >4 cm, è storicamente consigliabile mantenere un margine di escissione di almeno 3 cm, anticipando al proprietario il possibile ricorso a terapie postoperatorie non chirurgiche come radioterapia e/o chemioterapia, in base ai risultati evinti dall'esame istologico e immunohistochimico su mastocitoma e relativo linfonodo.^{1,16}

Nel caso in cui il rispetto del margine consigliato preveda chirurgie complesse, la dose chirurgica applicata deve mirare a ottenere il più ampio margine possibile che permetta di ridurre al minimo il rischio di complicanze e il conseguente ritardo di accesso alle eventuali terapie adiuvanti locali.

Se il tumore primario è localizzato in sedi anatomiche che non consentono l'escissione secondo i termini sopra descritti, la chirurgia può essere preceduta da terapie neoadiuvanti citoriduttive, con lo scopo di rendere il tumore trattabile chirurgicamente.^{17,18}

È opinione degli autori che, a seguito di citoriduzione neoadiuvante, il margine di escissione debba essere il più ampio possibile, riassegnato sulla base delle nuove dimensioni del mastocitoma, anticipando in ogni caso al proprietario che la radicalità di escissione potrebbe non essere garantita, richiedendo quindi una terapia adiuvante.^{5,23}

La bassa evidenza scientifica in merito alla dose chirurgica da applicare ai mastocitomi cutanei è ancora più manifesta nel caso di mastocitomi sottocutanei. Sebbene il comportamento clinico sia considerato meno aggressivo della controparte cutanea,¹⁹⁻²¹ in alcuni casi la forma sottocutanea dimostra un comportamento biologico altrettanto maligno. Inoltre, considerando la natura infiltrante del tumore, la maggior lassità del tessuto sottocutaneo, e la scarsa definizione clinica dei margini, gli autori consigliano di eseguire sempre, indipendentemente dal diametro maggiore, una escissione ad ampio mar-

gine rispettando, ove la sede anatomica lo consenta, i 2-3 cm di margine laterale ed un piano fasciale nel margine profondo.

Nel caso di margini infiltrati, la re-escissione chirurgica della cicatrice con 3 cm di margine o la radioterapia adiuvante determina un significativo prolungamento sia del controllo locale sia della sopravvivenza, indipendentemente dal grado istologico del mastocitoma primitivo.²²

• **Asportazione del linfonodo sentinella**

Oltre alla rimozione del tumore primitivo, è necessaria anche la linfadenectomia del linfonodo sentinella^{3,24} e la relativa classificazione istologica linfonodale.²⁵

La localizzazione del linfonodo non deve rappresentare un limite alla sua escissione. Solo nel caso non sia possibile ricercare il linfonodo sentinella (principalmente per motivazioni gestionali e/o economiche), si può optare per la rimozione del linfonodo regionale, tenendo però in debita considerazione che si è visto non coincidere con il linfonodo sentinella nel 27-60% dei casi.²⁶⁻³³ In questo particolare caso, considerando la potenziale morbilità associata alla linfadenectomia, l'opportunità di eseguire l'asportazione del linfonodo regionale dovrà essere valutata caso per caso.

Non esistono, infine, indicazioni precise sulla sequenza di rimozione del tumore primitivo rispetto al linfonodo sentinella, quando eseguite durante la medesima seduta chirurgica.

• **Invio dei campioni all'anatomia patologica**

Compito del chirurgo è l'allestimento di tutto il materiale esciso da inviare al patologo, orientando il campione nello spazio mediante colorazione dei margini con apposito colorante e/o con applicazione di suture, e mantenendone la stratigrafia (ad esempio, suturando i vari piani tra loro), per consentire un'adeguata valutazione della periferia della lesione e la corretta diagnosi dei margini istopatologici.^{34,35}

Qualità dell'evidenza	Raccomandazione clinica	Forza della raccomandazione clinica
Moderata (6,11)	L'asportazione del mastocitoma primitivo deve essere eseguita con un margine profondo corrispondente almeno ad un piano fasciale macroscopicamente non infiltrato	Positiva forte
Moderata (12-15)	L'escissione chirurgica del mastocitoma può essere eseguita con il metodo proporzionale per noduli di diametro maggiore <2 cm, in assenza di caratteristiche cliniche/citologiche di malignità, ma deve	Positiva forte

	comprendere almeno 0,5 cm di tessuto sano lateralmente alla lesione	
Moderata (1,6,16)	Per mastocitomi di diametro maggiore di 2-4 cm, il margine di escissione laterale deve essere di almeno 2 cm	Positiva forte
Bassa (1,16)	Mastocitomi di diametro maggiore >4 cm devono essere asportati con un margine laterale di almeno 3 cm e un piano fasciale macroscopicamente non infiltrato in profondità	Positiva forte
Bassa (1,6,16)	Mastocitomi con caratteristiche cliniche e citologiche di aggressività devono essere asportati con un margine laterale di almeno 3 cm e un piano fasciale macroscopicamente non infiltrato in profondità	Positiva forte
Moderata (3,24,28,29,31)	L'asportazione del linfonodo sentinella dovrebbe essere sempre considerata contestualmente alla rimozione del tumore primitivo, anche per mastocitomi sottocutanei	Positiva forte
Moderata (2,24)	La linfadenectomia contestuale alla rimozione del tumore primitivo prolunga la sopravvivenza dei cani con mastocitoma cutaneo in stadio II	Positiva forte
Moderata (2,3,26,31)	Il linfonodo regionale, se il linfonodo sentinella non è individuabile, dovrebbe essere asportato contestualmente alla massa primaria, valutando caso per caso la morbilità della linfadenectomia	Positiva debole
Bassa (19)	In caso di mastocitomi sottocutanei, i margini di escissione devono essere maggiori rispetto a quelli richiesti per mastocitomi cutanei di uguale dimensione, in quanto la possibilità di infiltrazione dei tessuti adiacenti è maggiore in questa sede	Positiva forte
Moderata (17)	A seguito di citoriduzione neoadiuvante, il margine di escissione dovrebbe essere il più ampio possibile, riassegnato sulla base delle nuove dimensioni del mastocitoma	Positiva debole
Alta (35)	Tutti i campioni chirurgici asportati devono essere sottoposti ad indagini istologica, considerandola parte integrante dell'intervento chirurgico	Positiva forte

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

TERAPIA MEDICA

La terapia medica per il mastocitoma cutaneo del cane, che si avvale di farmaci citotossici e/o citostatici, ha indicazioni precise e può essere somministrata in regime

Tabella 1 - Farmaci utilizzati e risposte ottenute sulla malattia macroscopica.

Farmaco/i	Nr cani	Grado istologico	CR %	PR%	Referenze
Prednisone	13	n=1 1P + n=11 2P; n=13 LK	0	61	17
Prednisone	25	n=2 2P + n=3 3P	4	16	36
Vinblastina	51	n=24 2P + n=26 3P	5	17	37
Prednisone e Vinblastina	15	n=5 2P + n=10 3P	33	13	9
Prednisone e Vinblastina	28	n=23 2P + n=4 3P	4	39	38
Vinblastina, Ciclofosfamide e Prednisone	11	n=4 2P + n=7 3P	46	18	39
Lomustina	23	n=1 1P + n=10 2P + n=8 3P	4	37	40
Vinblastina e Lomustina	37	n=12 2P + n=17 3P	24	12	41
Vinblastina, Lomustina e prednisone	17	n=2 2P + n=8 3P	29	35	42
Lomustina e Toceranib	41	ND	37	10	43
Lomustina e Toceranib	10	2P + 3P (numero per categoria sconosciuto)	30	20	44
Toceranib	145	n=1 1P + n=108 2P + n=36 3P	14	41	45
Toceranib e prednisone	60	n=47 2P + n=10 3P	17	47	38
Vinblastina, Toceranib e Prednisolone	16	n=14 2P + n=2 3P; n=13 LK + n=3 HK	38	50	46
Clorambucile e Prednisolone	21	n=13 2P + n=3 3P	14	29	47
Masitinib	26	n=16 2P + n=9 3P	27	15	48
Masitinib	39	n=19 2P + n=10 3P; n=4 LK + n=3 HK	38	44	49
Imatinib	21	n=7 2P + n=3 3P	5	19	50

Grado istologico: P: Patnaik; K: Kiupel; LK: low Kiupel; HK: high Kiupel; CR: remissione completa; PR: remissione parziale; ND: non disponibile

adiuvante, neoadiuvante o come unico trattamento in casi selezionati.

Non esistono al momento linee guida circa i farmaci e le eventuali combinazioni da preferire in prima linea. La Tabella 1 mostra le risposte ottenute sulla malattia macroscopica in funzione del regime farmacologico utilizzato.

• Terapia medica neoadiuvante

La terapia sistemica neoadiuvante si riferisce al trattamento sistemico del mastocitoma prima della terapia chirurgica potenzialmente radicale. Tipicamente, il trattamento neoadiuvante consiste nella somministrazione di chemioterapia (terapia citotossica) o di inibitori tirosin-chinasici (terapia citostatica).

I regimi chemioterapici comunemente utilizzati nel contesto adiuvante sono efficaci anche come trattamenti neoadiuvanti.^{39,40,41,46}

Gli inibitori tirosin-chinasici (toceranib, masitinib) non sono da utilizzare in prima linea e l'indicazione per entrambi è sulla malattia macroscopica.

L'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) dichiara che masitinib deve essere utilizzato su mastocitomi inoperabili di grado 2-3P, con c-kit mutato. EMA ha dato pa-

tere negativo sull'utilizzo di masitinib su mastocitomi con c-kit non mutato.

Sempre secondo le indicazioni di EMA, toceranib è indicato per il trattamento di mastocitomi cutanei inoperabili o recidivanti di grado 2-3P, con c-kit wild-type o mutato. Le risposte oggettive sono migliori per mastocitomi con c-kit mutato.^{38,45}

Lo scopo principale della terapia neoadiuvante è quello di citoreducere il tumore, consentendo un intervento chirurgico meno esteso e minori complicanze post-operatorie. Inoltre, la terapia neoadiuvante, quando realmente indicata, consente anche una valutazione precoce dell'efficacia della terapia sistemica.^{39,40,41,46} In assenza di risposta o per risposte non soddisfacenti, è necessaria una ricalibrazione terapeutica adiuvante.

Sulla base delle conoscenze attuali, il grado istologico del tumore primitivo non si modificherebbe a seguito del trattamento farmacologico, mentre più incerto è l'effetto sul linfonodo sentinella, che potrebbe andare incontro a downstaging. Anche per questo motivo, è fondamentale conoscere lo stato del linfonodo sentinella prima di intraprendere una chemioterapia neoadiuvante, ottenendo dei preparati citologici.

In questo senso, l'attenzione è maggiormente concentrata sui casi con linfonodo positivo (N+) in fase pre-terapeutica, che successivamente vanno incontro a negativizzazione clinica. La mancata valutazione iniziale del linfonodo, prima della sua rimozione, può determinare falsi negativi, con ripercussioni sulle decisioni terapeutiche adiuvanti.

Qualità dell'evidenza	Raccomandazione clinica	Forza della raccomandazione clinica
Alta (17,18)	Il prednisone in regime neoadiuvante ridurrebbe significativamente le dimensioni del mastocitoma di basso grado senza modificarne le caratteristiche istologiche	Positiva debole
Moderata (39,40,41,46)	La chemioterapia e/o gli inibitori tirosin-chinasi riducono significativamente le dimensioni del mastocitoma e permettono di valutare precocemente l'efficacia della terapia nel setting adiuvante	Positiva forte
Moderata (9,39, 41,42,47,51)	I protocolli multifarmaco danno risposte oggettive superiori rispetto alla monoterapia	Positiva forte
Alta (38,45)	Nei cani con mastocitoma macroscopico c-kit wild type, il trattamento di prima linea può prevedere l'impiego di toceranib in alternativa a farmaci citotossici	Positiva debole
Alta (52)	Nei cani con mastocitoma macroscopico c-kit wild type, il trattamento di prima linea può prevedere l'impiego di masitinib	Negativa forte
Opinione espressa dal panel	La risposta ai farmaci chemioterapici e/o inibitori tirosin-chinasi non sarebbe duratura, pertanto sarebbero necessarie periodiche valutazioni cliniche (ogni 7-14 giorni) durante la terapia neoadiuvante per intervenire chirurgicamente non appena ritenuto possibile.	Positiva forte
Opinione espressa dal panel	La chirurgia definitiva dovrebbe essere programmata al recupero dalla tossicità del trattamento neoadiuvante	Positiva debole
Moderata (17)	A seguito di citoriduzione neoadiuvante, il margine di escissione dovrebbe essere il più ampio possibile, riassegnato sulla base delle nuove dimensioni del mastocitoma	Positiva debole
Opinione espressa dal panel	I cani inoperabili in progressione durante il trattamento neoadiuvante dovrebbero essere proposti per una nuova linea chemioterapica con l'obiettivo di ricreare l'opportunità chirurgica	Positiva debole

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

• Terapia medica adiuvante

Il ruolo del trattamento sistemico adiuvante (dopo chirurgia) è ampiamente consolidato per mastocitomi di alto grado istologico (Kiupel high [KH] o grado 3 Patnaik [3P]) e/o per casi con linfonodo sentinella HN3 e/o con metastasi distanti, in funzione della significativa riduzione del rischio di morte.

In generale, i mastocitomi di alto grado (Patnaik e/o Kiupel) richiedono una terapia farmacologica per l'elevato potenziale metastatico. Per cani in stadio I, il beneficio della chemioterapia non è stato accertato.

Per i mastocitomi di basso grado in stadio I, l'uso della chemioterapia adiuvante non trova evidenza in letteratura. Per margini chirurgici non radicali, la chemioterapia, essendo un trattamento sistemico e non locale, non rappresenta la prima scelta.

La scelta dei farmaci e delle combinazioni da impiegare deve essere effettuata valutando le caratteristiche del tumore primitivo e del paziente.

Qualità dell'evidenza	Raccomandazione clinica	Forza della raccomandazione clinica
Alta (1)	L'uso della chemioterapia adiuvante non è indicato per cani con mastocitoma di basso grado istologico in stadio I	Positiva forte
Moderata (53,54)	L'uso della chemioterapia adiuvante sarebbe indicato per cani con mastocitoma di basso grado istologico rimossi senza radicalità	Negativa debole
Moderata (55)	L'uso della chemioterapia adiuvante non è indicato per cani con mastocitoma di basso grado istologico con linfonodo HN2	Positiva debole
Moderata (7)	L'uso della chemioterapia adiuvante sarebbe indicato per cani con mastocitoma di basso grado istologico con linfonodo HN3	Positiva debole
Alta (9,10, 39,41,42, 56, 57, 58)	L'uso della chemioterapia adiuvante è indicato per cani con mastocitoma di alto grado istologico	Positiva forte
Bassa (7)	La chemioterapia adiuvante non sarebbe indicata per cani con mastocitoma di alto grado in stadio I	Positiva debole
Bassa (59)	L'utilizzo neoadiuvante e adiuvante di corticosteroidi non aumenterebbe il rischio di complicanze chirurgiche	Positiva debole
Bassa (59)	La chemioterapia adiuvante, somministrata entro 30 giorni dalla chirurgia, aumenterebbe il rischio di complicanze chirurgiche	Negativa debole
Opinione espressa dal panel	Per mastocitomi di alto grado e/o in presenza di linfonodi HN3, la chemioterapia adiuvante andrebbe iniziata a ferita chirurgica guarita e comunque entro 14 giorni	Positiva forte

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

Tabella 2 - Protocolli radioterapici e outcome.

Protocollo radioterapico	Popolazione	Outcome	Referenze
Cobalto 60; Dose totale 54 Gy in 18 frazioni elargite tre giorni a settimana	32 cani con mastocitoma di grado 2P incompletamente rimossi	6% recidiva a 1 anno e 12% a 2 anni. Tempo mediano alla recidiva 13 mesi.	67
Ortovoltaggio e megavoltaggio; Dose totale 46.2-48 Gy	37 cani con mastocitoma di grado 2P incompletamente rimossi	3% recidiva a 1 anno e 7% a 3 anni.	69
Cobalto 60; Dose totale di 48-57 Gy in 16-19 frazioni giornaliere	19 cani con mastocitoma in stadio II (n=1 P1, n=16 P2 e n=2 P3)	16% recidiva. Tempo mediano alla progressione 41 mesi.	68
Cobalto 60 o linac 4MV; Dose totale 52 Gy in 18 frazioni elargite tre giorni a settimana	31 cani con mastocitoma di grado 3P incompletamente rimossi	35% progressione a 1 anno e 74% a 2 anni. Tempo mediano alla progressione 28 mesi.	70
Cobalto 60; Dose totale 48 Gy in 15 frazioni giornaliere	45 cani con mastocitoma di grado 2P incompletamente rimossi	6.7% recidiva entro 7 mesi dalla fine del trattamento.	73
6MV ed elettroni; in 70% dei casi trattamento palliativo; in 30% dei casi trattamento frazionato	300 cani con mastocitoma incompletamente rimosso (32% alto rischio e 63% basso rischio)	6.7% recidiva dopo una mediana di 17.5 mesi (1-98)	72
Grado istologico: P: Patnaik.			

RADIOTERAPIA

L'adeguato controllo locoregionale è essenziale per migliorare la prognosi, dal momento che la recidiva locale si associa a maggiore rischio metastatico e ridotta sopravvivenza.^{22,23,60-62}

Le categorie più a rischio di recidiva includono i mastocitomi incompletamente rimossi di alto grado (3P, HK), e mastocitomi 2P con marker proliferativi aumentati,^{23,62-64} così come mastocitomi 3P o HK completamente rimossi se il diametro è >3 cm, l'indice mitotico è >15, o il margine chirurgico è <1 cm.^{7,60,63}

Viceversa, il rischio di recidiva è basso nei mastocitomi di grado 1-2P/LK con marker proliferativi bassi.^{61,64}

La radioterapia adiuvante è considerata il trattamento d'elezione per tutti i mastocitomi ad alto rischio di recidiva, soprattutto se la revisione chirurgica non è possibile.^{65,66}

I diversi protocolli di radioterapia riportati in letteratura per il trattamento adiuvante dei mastocitomi sono riportati in Tabella 2.⁶⁷⁻⁷³

La dose totale o il regime di frazionamento ottimale per il trattamento del mastocitoma non è ancora stato stabilito, ma la radioterapia è efficace nel prevenire la recidiva locale, a prescindere dal grado istologico, in più del 90% dei casi.⁷²

L'irradiazione profilattica del linfonodo regionale migliora il controllo loco-regionale, e quindi la sopravvivenza, nei

mastocitomi di alto grado.^{10,60,74}

La radioterapia può essere usata anche come trattamento primario dei mastocitomi non asportabili chirurgicamente, anche in associazione a steroidi o toceranib, includendo nel campo anche i linfonodi regionali (se metastatici o in presenza di mastocitomi "high risk").^{75,76}

Effetti collaterali acuti a livello della cute o delle mucose sono comuni in tutti i cani con mastocitoma macroscopico o microscopico trattati con radioterapia. La tossicità è per lo più lieve e autolimitante. Effetti collaterali a lungo termine sono rari.⁹⁶

Qualità dell'evidenza	Raccomandazione clinica	Forza della raccomandazione clinica
Moderata (62-64)	La radioterapia adiuvante è indicata per il trattamento di mastocitomi di alto grado rimossi senza radicalità	Positiva forte
Moderata (7,60,63)	La radioterapia adiuvante è indicata per mastocitomi di alto grado, completamente asportati, se il diametro è >3 cm, l'indice mitotico è >15, o il margine chirurgico è <1 cm	Positiva forte
Moderata (22,23)	In cani con mastocitoma di grado 2 Patnaik con marker proliferativi alti e margini istologici incompleti,	Positiva forte

	la radioterapia adiuvante può essere presa in considerazione in alternativa alla radicalizzazione chirurgica	
Moderata (61,64)	In cani con mastocitoma di grado 1-2 Patnaik, margini istologici infiltrati e marker proliferativi bassi, la radioterapia adiuvante potrebbe non essere necessaria	Positiva debole
Moderata (10,60,74)	L'irradiazione del linfonodo regionale migliora il controllo loco-regionale, e quindi la sopravvivenza, nei cani con mastocitomi di alto grado.	Positiva forte
Moderata (75,76)	Nei cani con mastocitoma inoperabile, la radioterapia con o senza terapia medica dovrebbe essere presa in considerazione come opzione terapeutica di prima intenzione	Positiva forte
Opinione espressa dal panel	La radioterapia adiuvante deve essere idealmente iniziata 2-4 settimane dopo la chirurgia o comunque a guarigione avvenuta	Positiva forte
Opinione espressa dal panel	Per definire il campo da irradiare dopo chirurgia è utile disporre di fotografie pre-chirurgiche con misurazione del mastocitoma o delle immagini TC pre-operatorie	Positiva forte
Opinione espressa dal panel	Se la radioterapia entra nel planning terapeutico, è utile contattare il radio-oncologo prima di intervenire chirurgicamente, per ottimizzare il posizionamento della cicatrice con lo scopo di evitare effetti collaterali	Positiva forte
Raccomandazioni espresse unanimemente. Nessuno astenuto per conflitto di interesse e nessuno contrario.		

chiave nel mastocitoma cutaneo del cane e deve pertanto essere indicato in ogni referto istopatologico.⁹⁷

Il grading di Kiupel ha dimostrato una maggiore oggettività e riproducibilità rispetto al precedente grading di Patnaik, ma entrambi i sistemi rappresentano fattori prognostici indipendenti.⁷⁷⁻⁷⁹

Diversi studi hanno applicato entrambi i sistemi di grading alla stessa popolazione di cani. In questi studi, tutti i tumori di grado 1P erano di basso grado secondo Kiupel (LK) e tutti i tumori 3P erano di alto grado secondo Kiupel (HK), mentre nell'ambito dei mastocitomi 2P era possibile identificare una maggioranza di tumori LK e una proporzione minore (8-21%) di tumori HK.^{63,79-82} Utilizzando insieme il sistema di classificazione Patnaik e Kiupel, i MCT cutanei possono pertanto essere suddivisi in 4 categorie con prognosi diversa (Figura 1). L'evidenza è ancora debole, ma è possibile che i due sistemi di grading possano avere una valenza complementare, in quanto il sistema Kiupel permette di definire meglio la prognosi dei mastocitomi 2P, mentre il sistema Patnaik potrebbe stratificare il livello di aggressività dei mastocitomi HK.⁷⁷⁻⁷⁹

Per quanto riguarda i mastocitomi sottocutanei, è stato loro attribuito un comportamento biologico meno aggressivo rispetto ai mastocitomi cutanei.¹⁹⁻²¹

Nei mastocitomi sottocutanei senza invasione dermica, l'applicazione del sistema di Kiupel porta pressoché esclusivamente all'identificazione di tumori di basso grado. Pertanto attualmente, per questa specifica categoria di tumori, i fattori istologici che si considerano associati a una prognosi negativa sono rappresentati da conta mitotica >4, pattern di crescita infiltrante e presenza di cellule bi- o multinucleate.²¹

Per i mastocitomi sottocutanei con evidente invasione dermica, in assenza di studi specifici, è comunque consigliabile utilizzare il grading di Kiupel.

INDAGINI DI LABORATORIO

• Grading istologico

Il grado istologico rappresenta un fattore prognostico

• Valutazione dei margini chirurgici

Attualmente in medicina veterinaria non esiste un con-

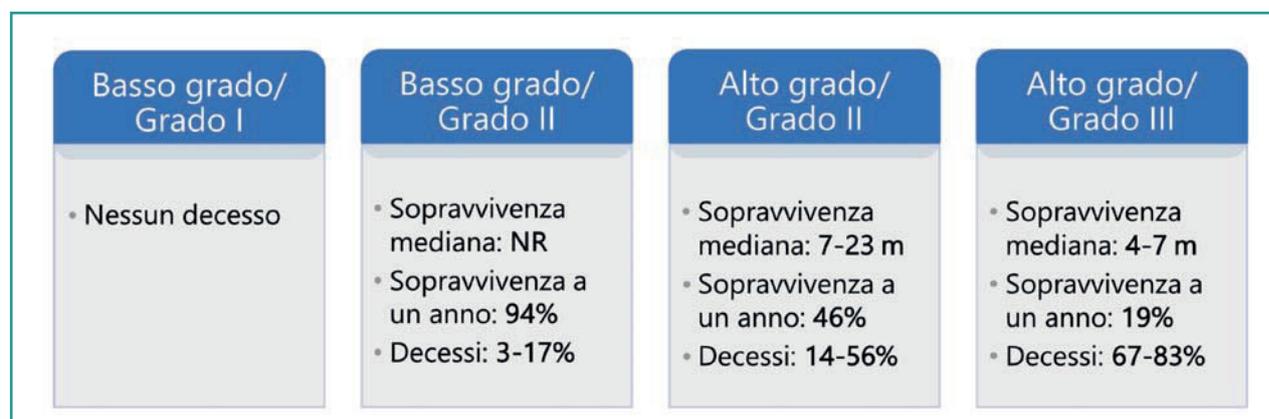


Figura 1 - Outcome stratificato in base all'applicazione contemporanea dei grading di Kiupel e Patnaik. NR = non raggiunta; m = mesi.

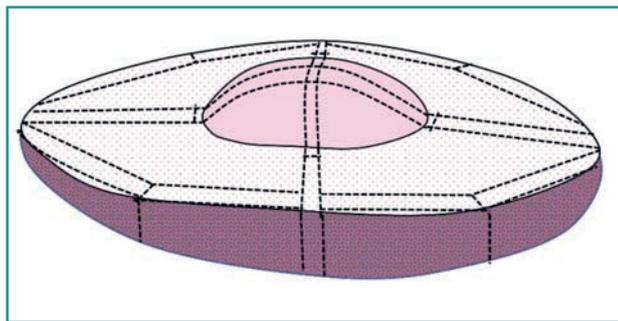


Figura 2 - Schema per la valutazione istologica dei margini chirurgici con tecnica combinata tangenziale e radiale.

sensu sulle tecniche da utilizzare per la valutazione dei margini chirurgici dei mastocitomi. Allo stesso modo manca una definizione univoca di margini esigui (*clean but close*) ed è ancora incerto il significato prognostico che deve essere loro attribuito.⁸³

Secondo uno studio recente, la tecnica tangenziale (perimetrale), che permette di valutare una superficie maggiore, sarebbe più accurata rispetto a quella radiale (*cross-sectioning*) nel predire la recidiva nei mastocitomi sottocutanei e cutanei di basso grado.⁸⁴ Tuttavia questa tecnica, in caso di margine non infiltrato, non permette di valutare la distanza del tumore dal margine chirurgico ed è complesso da applicare nella valutazione del margine profondo.^{55,85} L'approccio migliore potrebbe essere pertanto quello combinato, basato sulla valutazione tangenziale dei margini laterali e radiale del margine profondo (Figura 2).

Al di là della tecnica utilizzata, sono sempre maggiori le evidenze scientifiche a supporto del fatto che il grado istologico del tumore può rappresentare un fattore predittivo di recidiva locale più importante rispetto all'identificazione di cellule neoplastiche a livello di margine chirurgico.⁸⁵ Nello specifico, è stato dimostrato come i mastocitomi di alto grado tendano a recidivare molto più frequentemente rispetto ai mastocitomi di basso grado e sottocutanei, a prescindere dallo stato dei margini.^{21,63} Allo stesso modo, mastocitomi di basso grado con margini non radicali possono non recidivare o comunque associarsi ad un lungo intervallo libero.^{22,86}

• Ricerca delle metastasi linfonodali

La ricerca delle metastasi linfonodali deve essere effettuata sezionando il linfonodo a metà lungo l'asse longitudinale ed effettuando tagli multipli al microtomo di ciascuna metà. Per ottenere un buon livello di accuratezza può essere sufficiente effettuare un primo taglio e una *step section* a distanza di 200 μm dalla precedente. Si consiglia di colorare tutte le sezioni ottenute con colorazioni metacromatiche (blu di toluidina o Giemsa), al fine di identificare con buona attendibilità i foci metastatici precoci.⁸⁷

Per garantire uniformità e allineamento nelle decisioni terapeutiche successive, la valutazione istologica delle metastasi linfonodali deve essere effettuata secondo il sistema classificativo di Weishaar.²⁵

• Colorazioni speciali, immunoistochimica, indagini molecolari

Ki67 è una proteina nucleare che marca tutte le cellule in ciclo, rappresenta quindi un indicatore della frazione di crescita più accurato rispetto alla valutazione della conta mitotica. L'indice Ki-67 è stato significativamente associato a un aumento di mortalità, recidiva e metastasi indipendentemente dal grado del mastocitoma.^{88,89} Deve essere tuttavia specificato che i metodi di misurazione del Ki-67 index sono attualmente poco standardizzati tra i laboratori e ci sono differenze nei valori di soglia identificati nei vari studi, in parte anche a causa della variabilità delle tecniche di conteggio.

Un altro marker di proliferazione di utilità prognostica nel mastocitoma del cane è AgNOR, che mette in evidenza le proteine delle regioni organizzatrici del nucleolo. Il numero e la dimensione di queste proteine sono correlati alla velocità di progressione del ciclo cellulare. Combinando la valutazione della frazione di crescita (Ki67) con il tasso di proliferazione (AgNOR) è possibile ottenere la stima più accurata dell'attività proliferativa neoplastica (AgNOR x Ki-67 o Ag67).^{61,88-90}

Mutazioni attivanti del proto-oncogene c-kit a livello di esoni 8, 9 e 11 sono frequentemente riportate nei mastocitomi cutanei. Duplicazioni interne in tandem (ITD) nell'esone 11 si verificano nel 20% circa dei casi, soprattutto nei mastocitomi di alto grado, e sono state associate a un più elevato rischio di recidiva locale, metastasi e decesso.^{90,91} Le mutazioni a livello di esoni 8 e 9 si verificano in meno del 5% dei mastocitomi cutanei e sembrano essere meno rilevanti a fini prognostici.^{90,92} La presenza di mutazioni di c-kit è correlata, sebbene in modo non univoco, alla presenza di un pattern di espressione aberrante della proteina KIT, non più limitata alla membrana cellulare (KIT pattern 1) bensì intracitoplasmatico (KIT pattern 2 e 3).⁹¹ La valutazione dell'espressione della proteina KIT può essere effettuata nei laboratori di istopatologia mediante indagini immunoistochimiche (anticorpo CD117) sugli stessi campioni inviati per l'analisi istologica, mentre l'analisi mutazionale del gene c-kit richiede un saggio PCR e deve essere effettuata in laboratori di biologia molecolare a partire da campioni freschi o fissati in formalina e inclusi in paraffina, anche se in quest'ultimo caso l'accuratezza potrebbe diminuire.⁹³

La Figura 3 mostra un algoritmo per orientarsi nella richiesta di ulteriori colorazioni speciali, immunoistochimiche e indagini molecolari nel mastocitoma di cane.

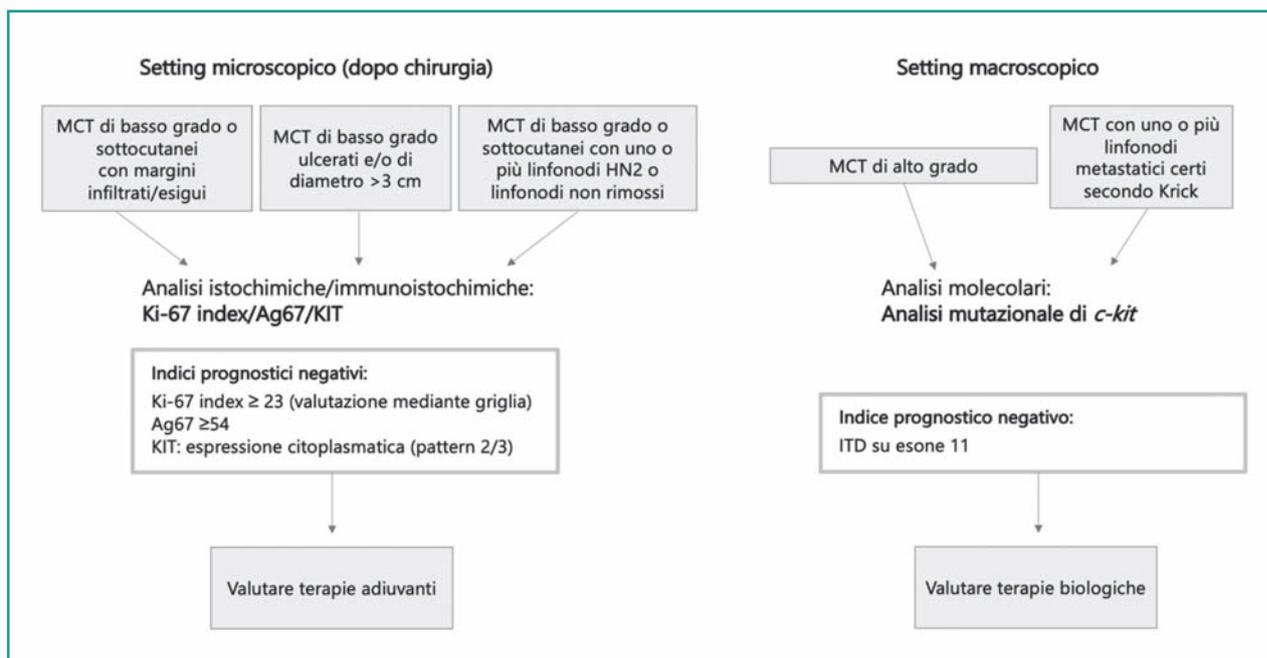


Figura 3 - Algoritmo per orientarsi nella richiesta di analisi di laboratorio aggiuntive.

Qualità dell'evidenza	Raccomandazione clinica	Forza della raccomandazione clinica
Alta (63,79-82)	I sistemi di grading di Kiupel e Patnaik possono avere una valenza complementare nei mastocitomi cutanei ed è preferibile riportarli entrambi	Positiva forte
Moderata (19-21)	Nei mastocitomi sottocutanei senza invasione dermica i fattori prognostici istopatologici sono rappresentati da conta mitotica >4, pattern di crescita infiltrante e presenza di cellule bi- o multinucleate	Positiva debole
Opinione espressa dal panel	Nei mastocitomi sottocutanei con invasione dermica è preferibile applicare il grading di Kiupel	Positiva debole
Bassa (84)	La tecnica tangenziale è più accurata nella valutazione dei margini laterali ed è preferibile utilizzarla in combinazione con quella radiale	Positiva forte
Bassa (63)	Nei mastocitomi di alto grado, la valutazione dei margini chirurgici può essere poco efficace nel predire la recidiva locale	Positiva forte
Bassa (87)	La ricerca delle metastasi linfonodali deve essere effettuata sezionando il linfonodo a metà lungo l'asse longitudinale ed effettuando al microtomo almeno un primo taglio e una <i>step section</i> a distanza di 200 µm dalla precedente del/i blocchetto/i ottenuto/i. Le sezioni devono essere colorate con colorazioni metacromatiche	Positiva forte

Moderata (2,3,25,87)	La ricerca delle metastasi linfonodali deve essere effettuata secondo il sistema di Weishaar	Positiva forte
Moderata (61,83,88-90)	La valutazione degli indici di proliferazione Ki-67 index e AgNOR può essere utile nel definire il comportamento biologico dei mastocitomi 2P-LK o sottocutanei con margini esigui o infiltrati, con linfonodi HN2 o non rimossi, o in presenza di fattori prognostici clinici negativi	Positiva forte
Bassa (98)	La valutazione immunohistochimica di KIT potrebbe essere richiesta per inquadrare il comportamento biologico dei mastocitomi escissi	Positiva debole
Moderata (90, 91)	La valutazione dello stato mutazionale di c-kit potrebbe essere richiesta per predire il comportamento biologico, che è più aggressivo in presenza di mutazioni ITD sull'esone 11.	Positiva debole
Moderata (83,90,91)	La valutazione dello stato mutazionale di c-kit dovrebbe essere richiesta nei mastocitomi con malattia macroscopica per predire la potenziale efficacia di masitinib	Positiva debole
Alta (45)	La valutazione dello stato mutazionale di c-kit potrebbe essere richiesta nei mastocitomi con malattia macroscopica per predire il tasso di risposta a toceranib, che è maggiore in caso di mutazione ITD sull'esone 11	Positiva debole

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

SIONCOV 2022 guidelines for the treatment and histopathologic diagnosis of canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors

Summary

The impetuous acquisition of information that derives from the thriving literature and the objective of aligning research in the field of veterinary oncology with international standards by adhering to the rules of Good Clinical Practice, guidelines have been formulated, which are easy to consult and reflect the best available published scientific evidence. With this in mind, the guidelines to be followed for the treatment and histopathologic evaluation of cutaneous and subcutaneous mast cell tumors in dogs have been drawn up by a Panel of Experts and reviewed by External Auditors. The document is not intended to be permanent, reflecting current medical knowledge.

BIBLIOGRAFIA

- Blackwood L, Murphy S, Buracco P *et al.* European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary Comparative Oncology* 10:e1-e29, 2012.
- Marconato L, Polton G, Stefanello D *et al.* Therapeutic impact of regional lymphadenectomy in canine stage II cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 16:580-589, 2018.
- Marconato L, Stefanello D, Kiupel M *et al.* Adjuvant medical therapy provides no therapeutic benefit in the treatment of dogs with low-grade mast cell tumours and early nodal metastasis undergoing surgery. *Veterinary Comparative Oncology* 18:409-415, 2020.
- Schultheiss PC, Gardiner DW, Rao S *et al.* Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 238, 1464-1469, 2011.
- Seguin B, Leibman NF, Bregazzi VS *et al.* Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218, 1120-1123, 2001.
- Selmic LE, Ruple A. A systematic review of surgical margins utilized for removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. *BMC Vet Res* 16, 5, 2020.
- Moore AS, Frimberger AE, Taylor D *et al.* Retrospective outcome evaluation for dogs with surgically excised, solitary Kiupel high-grade, cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 18:402-408, 2020.
- Guerra D, Faroni E, Sabbatini S *et al.* Histologic grade has a higher-weighted value than nodal status as predictor of outcome in dogs with cutaneous mast cell tumours and overtly metastatic sentinel lymph nodes. *Veterinary Comparative Oncology* 2022 Feb 23. In press
- Thamm DH, Mauldin EA, Vail DM. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor-41 cases (1992-1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13:491-497, 1999.
- Thamm DH, Turek MM, Vail DM. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high risk canine mast cell tumour: 61 cases. *The Journal of Veterinary Medical Science* 68: 581-587, 2006.
- Simpson AM, Ludwig LL, Newman SJ *et al.* Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224: 236-240, 2004.
- Abrams BE, Putterman AB, Ruple A *et al.* Variability in tumor margin reporting for soft tissue sarcoma and cutaneous mast cell tumors in dogs: A systematic review. *Veterinary Surgery* 50, 259-272, 2021.
- Chu ML, Hayes GM, Henry JG *et al.* Comparison of lateral surgical margins of up to two centimeters with margins of three centimeters for achieving tumor-free histologic margins following excision of grade I or II cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 256, 567-572, 2020.
- Pratschke KM, Atherton MJ, Sillito JA *et al.* Evaluation of a modified proportional margins approach for surgical resection of mast cell tumors in dogs: 40 cases (2008-2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 243, 1436-1441, 2013.
- Saunders H, Thomson MJ, O'Connell K *et al.* Evaluation of a modified proportional margin approach for complete surgical excision of canine cutaneous mast cell tumours and its association with clinical outcome. *Veterinary Comparative Oncology* 19, 604-615, 2021.
- Fulcher RP, Ludwig LL, Bergman PJ *et al.* Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 228: 210-5, 2006.
- Linde KJ, Stockdale SL, Mison MB, Perry JA. The effect of prednisone on histologic and gross characteristics in canine mast cell tumors. *The Canadian Veterinary Journal* 62: 45-50, 2021.
- Stanclift RM, Gilson SD. Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 232: 53-62, 2008.
- Gill V, Leibman N, Monette S *et al.* Prognostic Indicators and Clinical Outcome in Dogs with Subcutaneous Mast Cell Tumors Treated with Surgery Alone: 43 Cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 56, 215-225, 2020.
- Newman SJ, Mrkonjich L, Walker KK, Rohrbach BW. Canine Subcutaneous Mast Cell Tumour: Diagnosis and Prognosis. *Journal of Comparative Pathology* 136, 231-239, 2007.
- Thompson JJ, Pearl DL, Yager JA *et al.* Canine Subcutaneous Mast Cell Tumor: Characterization and Prognostic Indices. *Veterinary Pathology* 48, 156-168, 2011.
- Kry KL, Boston SE. Additional Local Therapy With Primary Re-Excision or Radiation Therapy Improves Survival and Local Control After Incomplete or Close Surgical Excision of Mast Cell Tumors in Dogs: Mast Cell Tumors in Dogs. *Veterinary Surgery* 43, 182-189, 2014.
- Séguin B, Besancon MF, McCallan JL *et al.* Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20: 933-940, 2006.
- Bae S, Milovancev M, Bartels C *et al.* Histologically low-grade, yet biologically high-grade, canine cutaneous mast cell tumours: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Veterinary Comparative Oncology* 18: 580-589, 2020.
- Weishaar KM, Thamm DH, Worley DR *et al.* Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. *Journal of Comparative Pathology* 151:329-338, 2014.
- Ferrari R, Marconato L, Buracco P *et al.* The impact of extirpation of non-palpable/normal-sized regional lymph nodes on staging of canine cutaneous mast cell tumours: A multicentric retrospective study. *Veterinary Comparative Oncology* 16: 505-510, 2018.
- Ferrari R, Chiti LE, Manfredi M *et al.* Biopsy of sentinel lymph nodes after injection of methylene blue and lymphoscintigraphic guidance in 30 dogs with mast cell tumors. *Veterinary Surgery* 49: 1099-1108, 2020.
- Ferrari R, Boracchi P, Chiti LE *et al.* Assessing the Risk of Nodal Metastases in Canine Integumentary Mast Cell Tumors: Is Sentinel Lymph Node Biopsy Always Necessary? *Animals (Basel)* 11: 2373,

- 2021.
29. Fournier Q, Thierry F, Longo M *et al.* Contrast-enhanced ultrasound for sentinel lymph node mapping in the routine staging of canine mast cell tumours: A feasibility study. *Veterinary Comparative Oncology* 19: 451-462, 2021.
 30. Wan J, Oblak ML, Ram A *et al.* Determining agreement between pre-operative computed tomography lymphography and indocyanine green near infrared fluorescence intraoperative imaging for sentinel lymph node mapping in dogs with oral tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 19: 295-303, 2021.
 31. Lapsley J, Hayes GM, Janvier V *et al.* Influence of locoregional lymph node aspiration cytology vs sentinel lymph node mapping and biopsy on disease stage assignment in dogs with integumentary mast cell tumors. *Veterinary Surgery* 50: 133-141, 2021.
 32. Worley DR. Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. *Veterinary Comparative Oncology* 12: 215-226, 2014.
 33. Sultani C, Patsikas MN, Mayer M *et al.* Contrast enhanced computed tomography assessment of superficial inguinal lymph node metastasis in canine mammary gland tumors. *Veterinary Radiology Ultrasound* 62: 557-567, 2021.
 34. Upchurch DA, Klocke EE, Henningson JN. Amount of skin shrinkage affecting tumor versus grossly normal marginal skin of dogs for cutaneous mast cell tumors excised with curative intent. *American Journal of Veterinary Research* 79, 779-786, 2018.
 35. Kamstock DA, Ehrhart EJ, Getzy DM *et al.* Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimens in veterinary surgical pathology. *Veterinary Pathology*; 48: 19-31, 2011.
 36. McCaw DL, Miller MA, Ogilvie GK *et al.* Stephen J. Response of Canine Mast Cell Tumors to Treatment With Oral Prednisone. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 8: 406-408, 1994.
 37. Rassnick KM, Bailey DB, Flory AB *et al.* Efficacy of Vinblastine for Treatment of Canine Mast Cell Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22: 1390-1396, 2008.
 38. Weishaar KM, Ehrhart EJ, Avery AC *et al.* c-Kit Mutation and Localization Status as Response Predictors in Mast Cell Tumors in Dogs Treated with Prednisone and Toceranib or Vinblastine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32: 394-405, 2018.
 39. Camps-Palau MA, Leibman NF, Elmslie R *et al.* Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997-2004). *Veterinary Comparative Oncology* 5: 156-167, 2007.
 40. Rassnick KM, Moore AS, Williams LE *et al.* Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (lomustine). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13:601-605, 1999.
 41. Cooper M, Tsai X, Bennett P. Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. *Veterinary Comparative Oncology* 7:196-206, 2009.
 42. Rassnick KM, Bailey DB, Russell DS *et al.* A phase II study to evaluate the toxicity and efficacy of alternating CCNU and high-dose vinblastine and prednisone (CVP) for treatment of dogs with high-grade, metastatic or nonresectable mast cell tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 8:138-152, 2010.
 43. Burton JH, Venable RO, Vail DM *et al.* Pulse-Administered Toceranib Phosphate Plus Lomustine for Treatment of Unresectable Mast Cell Tumors in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29:1098-1104, 2015.
 44. Bavcar S, de Vos J, Kessler M *et al.* Combination toceranib and lomustine shows frequent high grade toxicities when used for treatment of non-resectable or recurrent mast cell tumours in dogs: A European multicentre study. *The Veterinary Journal* 224: 1-6, 2017.
 45. London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL *et al.* Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clinical Cancer Research* 15: 3856-3865, 2009.
 46. Olsen JA, Thomson M, O'Connell K *et al.* Combination vinblastine, prednisolone and toceranib phosphate for treatment of grade II and III mast cell tumours in dogs. *Veterinary Medicine and Science* 4: 237-251, 2018.
 47. Taylor F, Gear R, Hoather *et al.* Chlorambucil and prednisolone chemotherapy for dogs with inoperable mast cell tumours: 21 cases. *Journal of Small Animal Practice* 50:284-289, 2009.
 48. Smrkovski OA, Essick L, Rohrbach BW *et al.* Masitinib mesylate for metastatic and non-resectable canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 13: 314-321, 2015.
 49. Grant J, North S, Lanore D. Clinical response of masitinib mesylate in the treatment of canine macroscopic mast cell tumours. *Journal of Small Animal Practice* 57: 283-290, 2016.
 50. Isotani M, Ishida N, Tomimaga M *et al.* Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22: 985-988, 2008.
 51. Gerritsen RJ, Teske E, Kraus JS *et al.* Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. *Veterinary Quarterly* 20: 28-31, 1998.
 52. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T *et al.* Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22: 1301-1309, 2008.
 53. Davies DR, Wyatt KM, Jardine JE *et al.* Vinblastine and prednisolone as adjunctive therapy for canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association* 40:124-130, 2004.
 54. Hosoya K, Kisseberth WC, Alvarez FJ *et al.* Adjuvant CCNU (lomustine) and prednisone chemotherapy for dogs with incompletely excised grade 2 mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association* 45: 14-18, 2009.
 55. Marconato L, Stefanello D, Kiupel M *et al.* Adjuvant medical therapy provides no therapeutic benefit in the treatment of dogs with low-grade mast cell tumours and early nodal metastasis undergoing surgery. *Veterinary Comparative Oncology* 18: 409-415, 2020.
 56. Hay JK, Larson VS. Lomustine (CCNU) and prednisone chemotherapy for high-grade completely excised canine mast cell tumors. *The Canadian Veterinary Journal* 60: 1326-1330, 2019.
 57. Todd JE, Nguyen SM, White J *et al.* Combination vinblastine and palladia for high-grade and metastatic mast cell tumors in dogs. *The Canadian Veterinary Journal* 62:1335-1340, 2021.
 58. Hayes A, Adams V, Smith K *et al.* Vinblastine and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 5: 168-76, 2007.
 59. Iodence AE, Wallace ML, Grimes JA *et al.* Dogs undergoing surgical excision of mast cell tumors are not at increased risk of incisional complications. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 260: S88-S95, 2021.
 60. Hume CT, Kiupel M, Rigatti L *et al.* Outcomes of dogs with grade 3 mast cell tumors: 43 cases (1997-2007). *Journal of the American Animal Hospital Association* 47: 37-44, 2011.
 61. Smith J, Kiupel M, Farrelly J *et al.* Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumours with a low AgNOR count and Ki67 index treated with surgery alone. *Veterinary Comparative Oncology* 15:36-45, 2017.
 62. Karbe GT, Davis E, Runge JJ *et al.* Evaluation of scar revision after inadequate primary excision of cutaneous mast cell tumors in 85 dogs (2000-2013). *Veterinary Surgery* 50: 807-815, 2021.
 63. Donnelly L, Mullin C, Balko J *et al.* Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 13: 70-76, 2015.
 64. Murphy S, Sparkes AH, Smith KC *et al.* Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. *Veterinary Record* 154: 743-746, 2004.
 65. O'Keefe DA. Canine mast cell tumors. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 20: 1105-1115, 1990.
 66. Govier SM. Principles of treatment for mast cell tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18: 103-106, 2003.
 67. al-Sarraf R, Mauldin GN, Patnaik AK *et al.* A prospective study of radiation therapy for the treatment of grade 2 mast cell tumors in 32 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10: 376-378, 1996.
 68. Chaffin K, Thrall DE. Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis. *Vet-*

- erinary Radiology Ultrasound 43: 392-395, 2002.
69. Frimberger AE, Moore AS, LaRue SM *et al.* Radiotherapy of incompletely resected, moderately differentiated mast cell tumors in the dog: 37 cases (1989-1993). *Journal of the American Animal Hospital Association* 33: 320-324, 1997.
 70. Hahn KA, King GK, Carreras JK. Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade-III mast cell tumors in dogs: 31 cases (1987-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224: 79-82, 2004.
 71. LaDue T, Price GS, Dodge R *et al.* Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumors. *Veterinary Radiology Ultrasound* 39:57-62, 1998.
 72. Mason SL, Pittaway C, Gil BP *et al.* Outcomes of adjunctive radiation therapy for the treatment of mast cell tumors in dogs and assessment of toxicity: A multicenter observational study of 300 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 35: 2853-2864, 2021.
 73. Poirier VJ, Adams WM, Forrest LJ *et al.* Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association* 42: 430-434, 2006.
 74. Mendez SE, Drobatz KJ, Duda LE *et al.* Treating the locoregional lymph nodes with radiation and/or surgery significantly improves outcome in dogs with high-grade mast cell tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 18: 239-246, 2020.
 75. Dobson J, Cohen S, Gould S. Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy. *Veterinary Comparative Oncology* 2: 132-141, 2004.
 76. Carlsten KS, London CA, Haney S *et al.* Multicenter prospective trial of hypofractionated radiation treatment, toceranib, and prednisone for measurable canine mast cell tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26: 135-141, 2012.
 77. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology* 21: 469-474, 1984.
 78. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL *et al.* Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology* 48: 147-155, 2011.
 79. Sabattini S, Scarpa F, Berlato D *et al.* Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3? *Veterinary Pathology* 52: 70-73, 2014.
 80. Vascellari M, Giantin M, Capello K *et al.* Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. *Veterinary Pathology* 50: 110-121, 2013.
 81. Stefanello D, Buracco P, Sabattini S *et al.* Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009-2014). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 246: 765-769, 2015.
 82. Horta RS, Lavallo GE, Monteiro LN *et al.* Assessment of canine mast cell tumor mortality risk based on clinical, histologic, immunohistochemical, and molecular features. *Veterinary Pathology* 55: 212-223, 2018.
 83. Bellamy E, Berlato D. Canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours: a review. *Journal of Small Animal Practice* 2021 Oct 20. In press
 84. Dores CB, Milovancev M, Russell DS. Comparison of histologic margin status in low-grade cutaneous and subcutaneous canine mast cell tumours examined by radial and tangential sections. *Veterinary Comparative Oncology* 16: 125-130, 2018.
 85. Meuten DJ, Moore FM, Donovan TA *et al.* International Guidelines for Veterinary Tumor Pathology: A Call to Action. *Veterinary Pathology* 58: 766-794, 2021.
 86. Michels GM, Knapp DW, DeNicola DB *et al.* Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histopathologically tumor-free versus nontumor-free margins: a retrospective study of 31 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 38: 458-466, 2002.
 87. Sabattini S, Faroni E, Renzi A *et al.* Longitudinal lymph node step-sectioning for the identification of metastatic disease in canine mast cell tumor. *Veterinary Pathology* 2022. In press.
 88. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA *et al.* Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology* 44: 298-308, 2007.
 89. Sledge DG, Webster J, Kiupel M. Canine cutaneous mast cell tumors: a combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *The Veterinary Journal* 215: 43-54, 2016.
 90. Kiupel M, Camus M. Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 49: 819-836, 2019.
 91. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB *et al.* The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 8: 104-111, 2006.
 92. Brocks BAW, Bertram CA, Bartel A *et al.* Internal Tandem Duplication of Exon 8 of *c-kit* Is Associated with Longer Total Survival in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology* 58: 315-324, 2021.
 93. Granato A, Giantin M, Ariani P *et al.* DNA and RNA isolation from canine oncologic formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for downstream «-omic» analyses: possible or not? *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 26: 117-124, 2014.
 94. Gil da Costa RM, Matos E, Rema A *et al.* CD117 immunorexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Veterinary Research* 3:19, 2007.
 95. London CA, Galli SJ, Yuuki T *et al.* Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental Hematology* 27: 689-697, 1999.
 96. Blackwood L, Tanis JB, Harper A *et al.* Acute radiotherapy toxicity in 57 dogs with gross and microscopic mast cell tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 16: 431-440, 2018.
 97. Berlato D, Bulman-Fleming J, Clifford CA *et al.* Value, Limitations, and Recommendations for Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Veterinary Pathology* 58: 858-863, 2021.
 98. Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB *et al.* The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 41:371-377, 2004.