



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**Le neoplasie mammarie della cagna:
revisione ed aggiornamento del protocollo
clinico**

Relatore
Prof. Antonio Mollo

Correlatore
Dott.ssa. Magdalena Schrank

Laureanda
Anna Cavallon
Matricola n. 1112043

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INTRODUZIONE

Nel corso degli anni la longevità degli animali da compagnia è aumentata, come anche l'attenzione che i proprietari prestano nei confronti delle loro cure. L'oncologia sia in ambito clinico veterinario che in ambito comparativo continua ad essere un tema di studio in costante progresso.

Le neoplasie mammarie si collocano ai primi posti tra le neoplasie più frequenti nella specie canina (Burrai et al., 2020) ed anche per questo motivo negli anni è stata prodotta ampia letteratura sull'argomento.

Le strutture veterinarie presenti sul territorio presentano caratteristiche estremamente variabili, sia in termini di competenze oncologiche dei professionisti che in termini di disponibilità di strumentazione. A questa grande variabilità possiamo affiancare anche quella relativa alle disponibilità economiche dei proprietari degli animali.

Nella pratica clinica può ancora capitare di ricevere in visita cagne affette da neoplasie mammarie in stadio avanzato ai cui proprietario è stato consigliato di "aspettare e vedere come queste si comportano". In altri casi si presentano pazienti con recidive o metastasi che sono stati precedentemente sottoposti a protocolli diagnostici e terapeutici non ottimali.

Questa tesi ha lo scopo di fornire un aggiornamento delle attuali conoscenze sulle patologie neoplastiche della mammella e sulle relative indicazioni cliniche e terapeutiche.

Partendo dall'anatomia della ghiandola mammaria verranno presentati dati sulla prevalenza dei tumori mammari nella cagna, trattando i fattori di rischio. A seguire verranno esposti gli aspetti più rilevanti della visita clinica, le possibilità diagnostiche e terapeutiche nonché i sistemi classificativi maggiormente utilizzati. Data la variabilità nelle caratteristiche dei tumori mammari risultano di fondamentale importanza i dati prognostici relativi alle caratteristiche delle neoplasie in sé ma anche quelli relativi alle terapie che si possono mettere in atto.

Alle informazioni riguardanti le neoplasie mammarie si è scelto di affiancare un capitolo in merito alla comunicazione con i proprietari per fornire degli strumenti che aiutino nella consultazione riguardante le decisioni che il proprietario deve prendere.

INDICE GENERALE

1. Aspetti generali
 - 1.1. Anatomia della ghiandola mammaria
 - 1.2. Drenaggio linfatico
 - 1.3. Incidenza dei tumori mammari nella cagna
 - 1.4. Principali fattori di rischio
 - 1.4.1. Età
 - 1.4.2. Esposizione ormonale: estrogeni e progesterone
 - 1.4.3. Razza
 - 1.4.4. Fattori dietetici e stato di nutrizione
 - 1.4.5. Gravidanza, lattazione e pseudogravidanza
2. Presentazione clinica: la prima visita
 - 2.1. Segnalamento, anamnesi ed esame fisico
 - 2.2. Ematologia / sierologia
 - 2.3. Il rapporto veterinario-proprietario
3. Diagnosi e stadiazione
 - 3.1. Citopatologia
 - 3.2. Il linfonodo sentinella
 - 3.3. Diagnostica per immagini
 - 3.4. Istopatologia ed immunoistochimica
 - 3.5. Stadiazione
4. Classificazione
 - 4.1. Classificazione su base istopatologica
 - 4.2. Grading
 - 4.3. Classificazione su base molecolare
5. Trattamento
 - 5.1. Chirurgia
 - 5.2. Chemioterapia
 - 5.3. Radioterapia
 - 5.4. Terapie verso target specifici
 - 5.4.1. Terapia ormonale
 - 5.4.2. Recettori tirosin kinasici

5.4.3. p53

5.4.4. Ciclossigenasi

5.4.5. Transizione epitelio-mesenchimale e cellule staminali tumorali

5.5. Immunoterapia

5.6. Altre terapie

6. Fattori prognostici

6.1. Fattori prognostici clinici

6.2. Fattori prognostici istopatologici

6.3. Fattori prognostici molecolari

6.4. Fattori prognostici relativi alla chirurgia

7. La comunicazione con il proprietario

Appendice

Bibliografia

1. Aspetti generali

1.1. Anatomia della ghiandola mammaria

La ghiandola mammaria è una ghiandola sudoripara modificata deputata alla produzione del latte, il suo secreto funge da nutrimento per i neonati e nelle prime ore di vita, grazie alla produzione di colostro, permette il trasferimento dell'immunità passiva (Dyce et al., 2010).

Le mammelle nella cagna sono disposte in due file paramediane dette linee mammarie, che si estendono dalla regione ascellare sino a quella inguinale (Dyce et al., 2010; Miller et al. 2012). Si contano normalmente 5 mammelle per lato ma è possibile una leggera variabilità sia nel numero sia nella posizione dei capezzoli, variabilità riscontrabile tra gli individui ma anche tra due linee dello stesso individuo (Dyce et al., 2010; Miller et al. 2012).

In base alla posizione lungo la linea mammaria possiamo suddividerle in due paia toraciche (craniale e caudale), due paia addominali (craniale e caudale) ed un paio inguinali (Dyce et al., 2010).

Istologicamente la ghiandola mammaria è una ghiandola tubulo-alveolare composta. Il parenchima costituito da lobi, lobuli ed alveoli viene circondato da uno stroma di tessuto connettivo, dotti, vasi e nervi (Dellmann ed Eurell, 2000).

Gli alveoli rappresentano le unità secernenti e sono rivestiti da epitelio semplice la cui altezza varia considerevolmente, da cubico a colonnare, in base allo stato di attività della ghiandola (Dellmann ed Eurell, 2000). La secrezione del latte fa dilatare il lume dell'alveolo e alveoli adiacenti possono in parte fondersi tra loro. In fase non secretoria le cellule secernenti tornano ad essere cubiche basse. Non tutti i lobuli della ghiandola sono contemporaneamente nella stessa fase secernente, mentre nello stesso lobulo tutti gli adenomeri si trovano all'incirca nella stessa fase secernente (Dellmann ed Eurell, 2000).

L'epitelio alveolare è circondato da cellule mioepiteliali, abbondanti anche a livello dei dotti e ricoperte dalla lamina basale. La contrazione delle cellule mioepiteliali, sotto lo stimolo dell'ossitocina rilasciata dalla neuroipofisi, permette l'eiezione del latte che passando per un sistema di dotti escretori giunge all'esterno attraverso il capezzolo (Dellmann ed Eurell, 2000).

Il sistema di dotti inizia con i dotti intralobulari che confluiscono nei dotti lobulari, a questo livello l'epitelio è cubico semplice diventando bistratificato distalmente. Man mano che questi dotti convergono nei dotti lattiferi lobari all'epitelio bistratificato si associano cellule

muscolari lisce disposte longitudinalmente. Il lume di questi dotti non ha un diametro uniforme, presenta dilatazioni e restringimenti, a livello di questi si possono trovare pieghe circolari contenenti tessuto muscolare liscio. Diversi dotti lattiferi si aprono a livello del seno lattifero alla base del capezzolo (Dellmann ed Eurell, 2000).

Il capezzolo contiene la parte terminale del sistema di dotti rappresentata dal seno del capezzolo che comunica con l'esterno attraverso i dotti papillari, questi in continuità con l'epidermide sono costituiti da epitelio squamoso stratificato cheratinizzato. Gli sbocchi delle ghiandole nella cagna possono variare da 7 a 16 per ogni capezzolo (Dellmann ed Eurell, 2000; Miller et al. 2012).). Uno sfintere di tessuto muscolare liscio disposto circolarmente impedisce al latte di defluire spontaneamente dal seno del capezzolo (Dellmann ed Eurell, 2000).

Il tessuto connettivo lasso che avvolge gli adenomeri fornisce supporto strutturale ed è ricco di vasi sanguigni, linfatici e nervi. Questo tessuto ospita anche plasmacellule e linfociti che risultano abbondanti nel peri-parto, quando viene secreto il colostro ricco di immunoglobuline (Dellmann ed Eurell, 2000). I setti che dividono il parenchima sono costituiti da tessuto connettivo denso irregolare ricco di fibre elastiche ed adipociti e sono in continuità con l'apparato sospenditore della ghiandola (Dellmann ed Eurell, 2000).

Il tessuto connettivo rappresenta la componente prevalente nel periodo pre-pubere, in seguito si riduce ed in caso di produzione latte i setti si assottigliano ulteriormente per far posto alla proliferazione alveolare (Dellmann ed Eurell, 2000). Al termine del periodo di lattazione o per arresto dello stimolo di suzione inizia l'involutione ghiandolare che vede nuovamente la prevalenza del tessuto interstiziale su quello secernente. Residui di caseina (*corpora amylacea*) possono permanere a livello di alveoli e dotti (Dellmann ed Eurell, 2000).

La cute che ricopre le mammelle è aderente all'involucro fibroelastico, è morbida e sottile verso la parte distale del capezzolo mentre aumenta di spessore verso la base. Mentre il capezzolo è privo di peli il resto della mammella è coperto da fini peli accompagnati da ghiandole sebacee. La cute può essere pigmentata per la presenza di melanociti nello strato basale dell'epidermide (Dellmann ed Eurell, 2000).

L'apporto vascolare arterioso delle ghiandole toraciche avviene attraverso l'arteria epigastrica craniale superficiale e da diramazioni dell'arteria toracica laterale ed intercostali. Le ghiandole addominali craniali sono irrorate dall'arteria epigastrica craniale superficiale che si anastomizza con l'epigastrica caudale superficiale. Le ghiandole

addominali caudali e quelle inguinali sono invece vascolarizzate dall'arteria epigastrica caudale superficiale (Miller et al. 2012). Le addominali caudali inoltre sono irrorate dall'arteria pudenda esterna e da diramazioni dell'arteria frenico-addominale; mentre alle ghiandole inguinali arrivano anche vasi della pudenda esterna e rami cutanei dell'arteria iliaca circonflessa profonda (Miller et al. 2012).

Le vene sono satelliti delle arterie. Le vene epigastriche superficiali craniale e caudale sono i vasi principali (Miller et al. 2012). Sia le vene che le arterie creano delle anastomosi formando plessi che possono attraversare la linea mediana e portarsi alle ghiandole controlaterali (Dyce et al., 2010; Sleecks et al., 2011). Le anastomosi venose sono di maggiore entità, questo può facilitare la disseminazione di cellule tumorali nella linea mammaria controlaterale (Sleecks et al., 2011).

Le ghiandole toraciche craniali sono innervate dai rami cutanei laterali del 4°, 5° e 6° paio di nervi intercostali, le ghiandole toraciche caudali dai rami cutanei laterali del 6° e 7° paio di nervi intercostali (Miller et al. 2012). Le ghiandole addominali ed inguinali sono innervate dal nervo genitofermorale e da rami cutanei ventrali dei primi tre nervi lombari (ileoipogastrico craniale e caudale ed ileoinguinale) (Miller et al. 2012). Fibre del simpatico affiancano i vasi sanguigni diretti alle mammelle (Miller et al. 2012).

1.2. Drenaggio linfatico

Il sistema linfatico assume notevole importanza per quanto riguarda il trasporto di cellule tumorali ed è considerato una delle principali vie di disseminazione metastatica (Patsikas et al., 2006). Per questo motivo è fondamentale definirne le connessioni anatomiche e gli eventuali cambiamenti di queste indotti dai processi neoplastici.

Ogni ghiandola possiede un proprio plesso di vasi linfatici a livello di parenchima che unendosi a quello presente a livello sottocutaneo formano vasi di maggior calibro che si dirigono verso i linfocentri drenanti (Miller et al. 2012).

Il drenaggio linfatico dei complessi mammari toracici si porta ipsilateralmente verso i linfonodi ascellari, le ghiandole addominali caudali ed inguinali drenano verso i linfonodi inguinali superficiali ipsilaterali (Patsikas & Dessiris, 1996b, 1996a; Pereira et al., 2008; Miller et al., 2012). Il drenaggio delle ghiandole addominali craniali si dirige sia verso i linfonodi ascellari che verso quelli inguinali superficiali, in alcuni casi vengono drenate solamente dagli ascellari mentre più raramente vengono coinvolti solo gli inguinali superficiali (Patsikas & Dessiris, 1996b, 1996a; Pereira et al., 2008; Miller et al., 2012).

Sono state dimostrate poi connessioni tra i linfonodi inguinali superficiali di destra e di sinistra (Patsikas & Dessiris, 1996b, 1996a; Pereira et al., 2008).

I siti di drenaggio linfatico sono stati indagati con diverse tecniche sia in cagne sane sia in cagne affette da neoplasie mammarie (Patsikas et al., 2006; Patsikas & Dessiris, 1996a, 1996b; Pereira et al., 2003; Pereira et al., 2008). L'opinione comune che risulta da questi studi è che le neoplasie mammarie possono modificare il pattern di drenaggio linfatico mediante la formazione di nuovi vasi ed il reclutamento di un più ampio numero di linfonodi e vasi linfatici precedentemente non pervi. In particolare, si è visto il possibile coinvolgimento dei linfonodi sternali per quanto riguarda le neoplasie delle ghiandole mammarie toraciche, i linfonodi iliaci mediali in caso di coinvolgimento delle ghiandole addominali craniali, i linfonodi ascellari per quanto riguarda le ghiandole addominali caudali ed infine il popliteo ed un plesso linfatico sottocutaneo mediale alla coscia per quanto concerne le ghiandole inguinali (Patsikas et al., 2006; Pereira et al., 2003; Pereira et al., 2008). A questa estensione delle afferenze linfonodali che rimangono ipsilaterali si aggiunge la comparsa di connessioni linfatiche anastomotiche tra le singole ghiandole (Patsikas et al., 2006; Pereira et al., 2003).

Tabella n.1 – Drenaggio linfatico delle ghiandole mammarie sane e neoplastiche. LN = linfonodi (Sorenmo et al., 2011) secondo gli studi di Patsikas 1996-2006

Ghiandole mammarie	Normale drenaggio linfatico	Drenaggio linfatico in corso di neoplasia
Toraciche craniali	LN ascellari	LN ascellari, LN sternali
Toraciche caudali	LN ascellari	LN ascellari, LN sternali
Addominali craniali	LN ascellari, LN inguinali superficiali	LN ascellari, LN inguinali superficiali, LN iliaci mediali
Addominali caudali	LN inguinali superficiali	LN inguinali superficiali, LN ascellari
Inguinali	LN inguinali superficiali	LN inguinali superficiali, LN poplitei, plesso linfatico mediale alla coscia

Con una frequenza crescente si sta rilevando che in corso di processi neoplastici non sempre i linfonodi regionali corrispondono ai linfonodi sentinella (Collivignarelli et al., 2021). Il linfonodo regionale drena l'area anatomica in cui si sviluppa il tumore, mentre il linfonodo sentinella drena il tumore (Collivignarelli et al., 2021; Patsikas et al., 2006; Pereira et al., 2008).

La teoria che sta alla base dei processi metastatici che prendono la via linfatica si basa sul ruolo che i linfonodi hanno come filtro e barriera alla successiva disseminazione di cellule neoplastiche. Sulla base di questo, lo stato dei linfonodi sentinella riflette lo stato dell'intero letto linfatico regionale in quanto le probabilità che i linfonodi non-sentinella siano coinvolti da metastasi quando quello sentinella ne è privo sono inferiori allo 0.1% (Collivignarelli et al., 2021).

La determinazione del pattern di drenaggio linfatico assume importanza nella scelta dei linfonodi da valutare per determinare la stadiazione delle neoplasie maligne, è di supporto inoltre nella scelta del protocollo chirurgico, nella scelta di eventuali trattamenti adiuvanti e nella determinazione di una più accurata prognosi post-chirurgica (Collivignarelli et al., 2021; Stefanello et al., 2021).

1.3. Incidenza dei tumori mammari nella cagna

I tumori delle ghiandole mammarie sono neoplasie comuni nella specie canina e sono i tumori più frequenti nelle femmine intere (Sleeckx et al., 2011). Rappresentano il 25-50% delle neoplasie diagnosticate nelle cagne e si stima che il 50% di queste siano maligne (Burrai et al., 2020). La prevalenza di questi tumori può variare tra i diversi Paesi in base all'abitudine di praticare l'ovariectomia/ovarioisterectomia in giovane età (Burrai et al., 2020; Collivignarelli et al., 2021).

Negli anni si è notato che il rapporto tra i tumori mammari maligni e quelli benigni si è spostato verso un aumento di quelli maligni, simile alle tendenze epidemiologiche osservate nella donna (Sorenmo et al., 2020). Le ghiandole mammarie addominali caudali ed inguinali sono quelle maggiormente colpite (Sleeckx et al., 2011).

Dal 50 al 70% dei cani con tumori mammari ha tumori multipli in quanto l'intera linea mammaria è esposta a fattori di crescita ed ormoni sessuali (Sorenmo et al., 2020). In caso di tumori mammari multipli, possono essere presenti diverse tipologie tumorali nello stesso soggetto (Sorenmo et al., 2009; Sleeckx et al., 2011). Cani con tumori mammari benigni presentano un rischio maggiore di sviluppare successivamente tumori maligni (Sorenmo et al., 2009). Alcuni tumori potrebbero non cambiare mai e rimanere piccoli e benigni, mentre altri progrediscono e diventano maligni; la progressione istologica verso la malignità è stata correlata al crescere delle dimensioni dei tumori (Sorenmo et al., 2009).

1.4. Principali fattori di rischio

Tra i principali bersagli delle mutazioni che causano tumori ci sono i protooncogeni che promuovono la crescita, oncosoppressori che inibiscono la crescita, geni che regolano l'apoptosi e geni coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA (Klopfleisch et al., 2011). A queste mutazioni possiamo aggiungere le modificazioni epigenetiche che agiscono mediante alterazioni dell'espressione genica (Klopfleisch et al., 2011). Ai meccanismi di sviluppo delle neoplasie mammarie si accompagnano fattori di rischio che comprendono principalmente l'età dei soggetti e la loro esposizione ad ormoni sessuali (Sorenmø et al., 2011).

1.4.1. Età

Le neoplasie mammarie colpiscono prevalentemente cani adulti ed anziani, in particolare le neoplasie maligne sono estremamente rare nelle cagne di età inferiore ai 5 anni (Sorenmø et al., 2011). L'età media alla diagnosi di tumori mammari maligni è di 9-11 anni mentre per quanto riguarda quelli benigni ci si sposta nella fascia di età di 7-9 anni (Sorenmø et al., 2011). La variabilità di questi range è dettata dal fatto che razze diverse hanno aspettative di vita diverse e dalla presenza di predisposizioni di razza che possono quindi influire su uno sviluppo precoce della patologia (Sorenmø et al., 2011). In generale possiamo affermare che cagne più giovani sviluppano prevalentemente tumori benigni e il rischio di malignità aumenta con l'età (Sorenmø et al., 2011). I tumori mammari benigni più frequenti sono i tumori benigni misti e gli adenomi complessi, mentre quelli maligni sono prevalentemente carcinomi semplici e carcinomi complessi (Canadas et al., 2019; Burrai et al., 2020).

1.4.2. Esposizione ormonale: estrogeni e progesterone

Alla pubertà le ghiandole vanno incontro ad uno sviluppo sotto l'influenza degli estrogeni ovarici, che porta alla proliferazione delle strutture duttali il cui picco si ha nel tardo diestro per l'influenza del progesterone (Dellmann ed Eurell, 2000). Con l'inizio dell'anestro si ha una progressiva regressione di queste strutture (Dellmann ed Eurell, 2000; Miller et al., 2012). Con l'instaurarsi di una gravidanza e l'aumento dei livelli di progesterone i dotti ghiandolari si allungano ed in seguito ramificano formando le unità secernenti tubuloalveolari (Dellmann ed Eurell, 2000). In caso di pseudogvidanza le ghiandole subiscono gli stessi cambiamenti ma con un minor sviluppo alveolare (Dellmann ed Eurell, 2000; Miller et al., 2012).

Gli steroidi ovarici stimolano quindi la crescita fisiologica del tessuto mammario ma allo stesso tempo il loro effetto proliferativo, agendo ad ogni ciclo ovarico, predispone la cagna a future cancerogenesi (Sleeckx et al., 2011).

Gli effetti cancerogeni degli estrogeni oltre ad essere mediati dal legame con i recettori ed essere legati ad una maggior produzione di fattori di crescita, con conseguente aumento della proliferazione cellulare, hanno anche effetti genotossici diretti, aumentando le mutazioni (Sorenmo et al., 2020). Gli effetti cancerogeni del progesterone, invece, si ritengono mediati dalla produzione dell'ormone della crescita (GH) e dei suoi recettori da parte della ghiandola mammaria (Sorenmo et al., 2020). Il GH ha effetti stimolatori diretti sui tessuti mammari ed effetti indiretti per aumento della produzione di IGF-1 (Sorenmo et al., 2020). IGF-1 è sia un fattore proliferativo sia un fattore di sopravvivenza per le cellule epiteliali della mammella e regola l'espressione di numerosi geni coinvolti nello sviluppo di neoplasie mammarie (Sorenmo et al., 2020).

Dagli studi originali di Schneider et al. (1969) emerge che le cagne sterilizzate prima del primo estro hanno un rischio soltanto dello 0.5% di sviluppare una neoplasia mammaria nel corso della loro vita. L'effetto protettivo dell'ovarioisterectomia diminuisce con i primi cicli estrali passando ad un rischio dell'8% e del 26% se eseguita rispettivamente prima del secondo o del terzo calore (Schneider et al., 1969). Non sono stati riscontrati benefici significativi se la sterilizzazione viene eseguita dopo i 4 anni di età. (Sorenmo et al., 2011). Dall'analisi di Burrai et al. emerge che l'83% delle neoplasie mammarie sono state diagnosticate in cagne intere, sostenendo l'effetto protettivo dell'ovarioisterectomia (Burrai et al., 2020).

Sebbene la prevenzione più efficace sia data dalla totale assenza degli effetti ovarici sulla ghiandola mammaria, un recente studio prospettico randomizzato ha documentato una significativa riduzione del rischio di sviluppo di nuovi tumori quando la sterilizzazione viene eseguita in concomitanza alla rimozione del tumore nei cani con neoplasie benigne (Kristiansen et al., 2016). Questo conferma il fatto che una privazione dello stimolo ormonale dovuta all'ovarioisterectomia tardiva riduce significativamente il rischio di sviluppare nuovi tumori. In un altro studio retrospettivo in cui si indagava se la sterilizzazione in concomitanza con la mastectomia aumentasse l'intervallo libero dalla malattia si è riscontrato un effettivo aumento di questo intervallo rispetto alle cagne non sterilizzate o precedentemente già sterilizzate (Banchi et al, 2021).

La somministrazione esogena di progestinici ed estrogeni ha dimostrato di indurre un aumento del rischio di sviluppo di tumore mammario nella cagna (Sorenmo et al., 2011). I cani trattati con progestinici hanno maggiore probabilità di sviluppare tumori in giovane età (Sorenmo et al., 2011). Anche se esistono alcune discordanze, la maggior parte delle ricerche concorda sul fatto che i progestinici in monoterapia a basso dosaggio aumentano il rischio di sviluppo di tumori, soprattutto benigni, mentre la combinazione di estrogeni e progestinici tende a indurre lo sviluppo di tumori maligni (Sorenmo et al. 2020).

1.4.3. Razza e predisposizione genetica

Dalla recente analisi statistica retrospettiva di Burrai et al. (2020) emerge che il 61% delle cagne con tumore mammario sono cagne di razza. Questi dati avvalorano quanto fino ad ora esposto in letteratura, ossia che la razza può essere un importante fattore di rischio (Sorenmo et al., 2020). In generale i tumori mammari tendono ad essere più comuni nelle razze di piccola taglia (Burrai et al., 2020). Tra le razze maggiormente coinvolte troviamo: Barboncino, Chihuahua, Bassotto Tedesco, Yorkshire Terrier, Maltese e Cocker Spaniel. Tuttavia, anche alcune delle razze di taglia più grande presentano un rischio aumentato: Springer Spaniel Inglesi (ESS), Setter Inglesi, Epagneul Breton, Pastori Tedeschi, Pointer Inglesi, Dobermann e Boxer (Sorenmo et al., 2020).

In letteratura sono presenti discrepanze nei dati di prevalenza in queste razze, con variabilità dettata dalla localizzazione geografica ma anche da linee genetiche della stessa razza (Sorenmo et al., 2020). Questo avvalora l'ipotesi di un'influenza genetica nello sviluppo dei tumori mammari. Sono diversi i geni candidati alla valutazione per la loro associazione con lo sviluppo dei tumori mammari nei cani, alcuni di questi sono BRCA1, BRCA2, RAD51, TP53, PTEN, CHEK2, TOX3 (Rivera et al., 2009). Ognuno dei geni che nell'ultimo decennio è stato sottoposto ad analisi è caratterizzato da un differente grado di coinvolgimento verso questa patologia. Un'attenzione particolare è stata riservata a BRCA1, BRCA2 e RAD51 dal momento che sono considerati ad alto rischio per lo sviluppo di tumori della mammella nella specie canina (Rivera & von Euler, 2011). Questi geni codificano per proteine coinvolte nella riparazione dei danni al DNA (Rivera et al., 2009; Klopffleisch et al., 2011), mutazioni a loro carico o un'alterata espressione portano ad una diminuzione della capacità di riparazione (Rivera & von Euler, 2011). I danni, accumulandosi, possono predisporre a nuove mutazioni ed alla trasformazione neoplastica delle cellule (Klopffleisch et al., 2011). Mutazioni a carico di BRCA1 e BRCA2 sembrano aumentare di quattro volte il rischio di sviluppare neoplasie mammarie in una

delle razze (ESS) considerate predisposte a questa patologie (Rivera et al., 2009). Dal momento che BRCA2 e RAD51 interagiscono nella riparazione del DNA, mutazioni che coinvolgono uno dei due possono portare ad alterazione del legame tra le proteine espresse e/o inficiare la loro attività riparativa (Thumser-Henner et al., 2020). Nelle donne con tumori al seno una sovraespressione di BRCA2 e RAD51 rispecchia un'instabilità genetica ed è associata ad una prognosi sfavorevole; BRCA1, invece, spesso va incontro a sottoespressione (Klopfleisch & Gruber, 2009). Il ruolo dell'alterata espressione dei geni omologhi nella cagna, tuttavia, non è ancora stato chiarito e necessita di ulteriori studi (Thumser-Henner et al., 2020).

Nella donna si è visto che pazienti con mutazioni di BRCA2 sono sensibili ad una classe di farmaci chiamata inibitori PARP (Poly ADP-Ribose Protein) (Thumser-Henner et al., 2020). In assenza di proteine BRCA2 funzionanti a causa delle mutazioni ed il concomitante blocco di PARP1 (un'altra proteina coinvolta nella riparazione del DNA), i danni nella cellula si accumulano portando verso la morte cellulare (Thumser-Henner et al., 2020). Ad oggi non sono presenti inibitori PARP approvati per la specie canina. A causa dello sviluppo di resistenza alla terapia e dei costi nell'ordine delle migliaia di euro mensili, nonché, dei possibili effetti collaterali, risulta difficile una loro applicazione in ambito veterinario in un futuro prossimo (Thumser-Henner et al., 2020).

1.4.4. Fattori dietetici e stato di nutrizione

Cagne nutrite mediante diete ad alto contenuto di carni rosse e che arrivano obese all'anno di età hanno mostrato una maggiore predisposizione allo sviluppo di neoplasie mammarie, mentre lo stato di nutrizione in età adulta in prossimità della diagnosi di neoplasie non sembra avere effetti su questa predisposizione (Sleeckx et al., 2011).

Uno dei meccanismi proposti secondo cui la dieta/obesità può essere collegata alla carcinogenesi mammaria è attraverso il suo effetto sui livelli sierici di estrogeni. L'obesità è associata ad una ridotta concentrazione di globulina legante gli ormoni sessuali (SHBG), questo si traduce in elevati livelli di estrogeni liberi nel siero (Sorenmo et al., 2020). Inoltre, i tessuti adiposi sono responsabili dell'aumento della produzione di estrogeni attraverso la conversione di androgeni mediata dall'aromatasi (Sorenmo et al., 2020). Al contrario, soggetti sottopeso nel primo anno di età sembrano avere una minore predisposizione allo sviluppo di neoplasie mammarie (Sorenmo et al., 2011).

1.4.5. Gravidanza, lattazione e pseudogavidanza

L'età alla prima gravidanza così come il numero di parti, di cuccioli e di lattazioni non sembra influire sulla possibile insorgenza di neoplasie mammarie nella cagna (Sorenmo et al., 2011). Il ruolo della pseudogavidanza nella cancerogenesi mammaria nella cagna invece presenta pareri discordanti, tuttavia, la maggior parte degli autori ritiene che non sia un fattore di rischio in quanto non sono presenti dati solidi in merito e l'assetto ormonale sia in termini di ormoni coinvolti che di durata della loro azione è analogo al normale ciclo estrale e alla gravidanza (Sleeckx et al., 2011).

2. Presentazione clinica: la prima visita

2.1. Segnalamento, anamnesi ed esame fisico

La presenza di masse a livello di ghiandole mammarie può essere un reperto occasionale rilevato dal veterinario durante visite routinarie oppure può capitare che i proprietari rilevino per primi l'anomalia e richiedano un consulto. Informazioni importanti derivano dal segnalamento del paziente in quanto come già detto le neoplasie mammarie si riscontrano prevalentemente in cagne intere, adulte o anziane, spesso di piccola taglia e con una certa prevalenza in alcune razze (Burrai et al., 2020; Sorenmo et al., 2011).

Altrettanto importante è l'anamnesi della cagna, i trattamenti farmacologici che ha subito, in particolar modo relativi a progestinici ed estrogeni, la regolarità del ciclo estrale ed altri aspetti relativi all'ambito riproduttivo quali gravidanze o pseudogravidanze (Cassali et al., 2014). Se la cagna fosse sterilizzata chiedere al proprietario l'età a cui è avvenuta la sterilizzazione. In alcuni casi si riesce a risalire anche all'anamnesi familiare, ipotizzando un'eventuale predisposizione di una linea genetica (Rivera et al., 2009). Se la lesione è stata notata dal proprietario cercare di risalire alla datazione approssimativa della rilevazione e la precedente storia di tumori (Cassali et al., 2013).

L'esame fisico comprende la valutazione dello stato generale del paziente e un esame specifico della ghiandola mammaria (Sleeckx et al., 2011). Idealmente, per un esame più accurato si esaminano le ghiandole mammarie con la cagna in decubito dorsale. Ogni ghiandola deve essere accuratamente palpata ed ispezionata (Sleeckx et al., 2011). Dal momento che le ghiandole maggiormente colpite sono le addominali caudali e le inguinali (Sleeckx et al., 2011; Sultani et al., 2016), particolare attenzione deve essere riposta nella palpazione di queste aree. La cute sovrastante la neoplasia può essere traumatizzata, ulcerata ed accompagnata da reazione infiammatoria locale (Sorenmo et al., 2009).

I tumori possono essere piccoli o grandi, mobili o meno, ulcerati, singoli o multipli (Cassali et al., 2014). Questo dipende anche dal momento in cui le cagne vengono portate in visita e quindi dal tempo che ha avuto la malattia per progredire (Cassali et al., 2014). I linfonodi possono essere clinicamente ingrossati, ma segni di malattia sistemica dati da metastasi a distanza sono rari in quanto spesso gli animali vengono portati regolarmente in visita (Sorenmo et al., 2011).

Nel suo studio prospettico, Sorenmo (2009) riporta una prevalenza di tumori multipli nel 70% dei soggetti esaminati. In cani con tumori multipli, di tutte le masse devono essere

annotare le caratteristiche, le dimensioni e l'esatta localizzazione di queste (Sorenmo et al., 2009).

L'ispezione dei linfonodi regionali periferici deve sempre essere inclusa nella valutazione clinica registrandone dimensione, mobilità, consistenza, distribuzione delle alterazioni (singolo linfonodo, linfonodi bilaterali o multipli) (Marconato & Foglia, 2021). È noto però che la dimensione dei linfonodi non è correlata con la presenza di metastasi: linfonodi non palpabili o normali possono infatti essere metastatici e, viceversa, linfonodi megalici possono essere soltanto reattivi a causa di una condizione di iperplasia o flogosi (Marconato & Foglia, 2021). In condizioni fisiologiche i linfonodi ascellari sono difficilmente palpabili come anche quelli inguinali superficiali in quanto localizzati in profondità nel grasso inguinale dell'ultimo paio di ghiandole mammarie, mentre possono essere individuati se aumentati di dimensioni (Marconato & Foglia, 2021).

È fondamentale però ricordare che i linfonodi drenanti regionali possono essere bypassati e non rappresentare il primo sito di drenaggio del tumore (Collivignarelli et al., 2021); inoltre, in seguito a sviluppo neoplastico, l'area di drenaggio può aumentare (Patsikas et al., 2006; Pereira et al., 2008; Collivignarelli et al., 2021). Queste caratteristiche vanno ad incidere sulla scelta dei successivi campionamenti a scopo diagnostico.

Particolare attenzione deve essere prestata all'esame fisico di un eventuale carcinoma mammario infiammatorio. Questa tipologia tumorale è rara ma può essere clinicamente difficile da distinguere da una mastite grave o da una dermatite grave (Sorenmo et al., 2011). Un carcinoma mammario infiammatorio si presenta con un coinvolgimento mammario molto esteso, con edema, gonfiore e dolore; ampia invasione dei vasi linfatici dermici e forte risposta infiammatoria (Sorenmo et al., 2011). Oltre ad avere un ampio coinvolgimento locoregionale, la maggior parte dei cani con carcinoma infiammatorio presenta segni sistemici di malattia, tra cui anoressia, perdita di peso e debolezza; spesso sono presenti anche metastasi a distanza rendendo questi cani, quindi, non candidati alla chirurgia. La sopravvivenza è scarsa. (Sorenmo et al., 2011; Sorenmo et al., 2020)

Siti di metastasi a distanza delle neoplasie mammarie includono primariamente linfonodi, fegato, polmoni ed ossa (Sleeckx et al., 2011). Altri siti di metastasi meno comuni sono SNC, milza, cute, occhi, ghiandole surrenali, utero, cuore, muscoli e pancreas (Sleeckx et al., 2011).

2.2. Ematologia / sierologia

Le indagini ematologiche routinarie (CBC) ed il profilo biochimico non presentano valori specifici per le neoplasie mammarie ma rimangono comunque indagini importanti prima di sottoporre l'animale ad anestesia e per rilevare concomitanti alterazioni dovute all'età dei soggetti o a sindromi paraneoplastiche (Sleeckx et al., 2011).

Anche se la metaplasia ossea si verifica occasionalmente nell'adenocarcinoma mammario e le ghiandole mammarie sono un sito comune per l'osteosarcoma extrascheletrico (Sorenmo et al., 2020), l'aumento dell'attività della fosfatasi alcalina totale sierica (TALP) nelle cagne con tumori mammari non ha dimostrato significato diagnostico per quanto riguarda la tipologia tumorale e nemmeno valore prognostico (Sorenmo et al., 2020). Non ci sono correlazioni tra la tipologia tumorale e l'aumento dell'isoenzima osseo (BALP) (Karayannopoulou et al., 2003, 2006). Bisogna tenere in considerazione inoltre che un possibile aumento può essere imputabile a patologie epatiche concomitanti che causano un aumento dell'isoenzima LALP o stress cronico con aumento dell'isoenzima indotto dai corticosteroidi CALP (Karayannopoulou et al., 2003, 2006).

Alterazioni del profilo coagulativo possono essere presenti in cagne con metastasi a distanza, necrosi tumorale o carcinoma infiammatorio; la loro frequenza aumenta con la progressione della malattia (Stockhaus et al., 1999). Inoltre, si può riscontrare un aumento delle proteine di fase acuta positive in presenza di metastasi, tumori di grandi dimensioni o ulcerazioni delle neoplasie (Tecles et al., 2009)

Per quanto riguarda i livelli sierici degli ormoni steroidei è stato constatato un significativo aumento di questi nelle cagne con tumori maligni in confronto ai livelli di cagne sane o con tumori benigni (Queiroga et al., 2005). Anche i livelli di prolattina nel siero sono risultati più elevati, sia in caso di neoplasie benigne che maligne (Queiroga et al., 2005). Si pensa che questi ormoni siano sintetizzati e secreti dalle ghiandole mammarie ed agiscano in modo autocrino/paracrino (Queiroga et al., 2005).

2.3. Il rapporto veterinario-proprietario

La prima visita è il momento in cui si formula un sospetto diagnostico e si coinvolge il proprietario nelle scelte future riguardanti il percorso clinico da intraprendere per raggiungere una diagnosi definitiva. Questa visita fornisce al veterinario l'opportunità di valutare il livello di coinvolgimento del proprietario e questa informazione, assieme a quella relativa alle condizioni generali del paziente, indicherà quale sia il trattamento più adeguato (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019).

Il modo in cui la diagnosi viene comunicata al proprietario è tanto importante quanto la diagnosi stessa. Uno degli obiettivi della prima visita è analizzare la situazione della famiglia e valutare il livello di attenzione del proprietario. Si dovranno chiarire eventuali dubbi e si dovrà concedere alle famiglie il tempo necessario per riflettere sulla migliore opzione per l'animale (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019). Nella scelta delle future azioni da intraprendere bisognerà prendere in considerazione anche le condizioni concomitanti tipicamente presenti in questi pazienti per lo più anziani (Sorenmo et al., 2011).

In occasione della prima visita dopo una diagnosi di tumore, il veterinario passerà probabilmente la maggior parte del tempo ad illustrare la malattia dell'animale, a rassicurare il proprietario e a risolvere eventuali dubbi (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019).

Tra le domande più comuni in occasione della prima visita spesso si sente "Perché il mio animale ha un tumore? Ho fatto qualcosa di sbagliato?" La maggior parte dei tumori è il risultato di mutazioni genetiche che si verificano nel corso della vita del paziente; è importante creare un clima di fiducia, facendo sì che il proprietario si senta parte del team. "Può guarire?" la risposta a questa domanda dipende dal tipo di tumore, nel caso di pazienti che presentano con neoplasie già in stadio avanzato e presenza di metastasi l'obiettivo sarà quello di supportare l'animale migliorandone sia la qualità sia l'aspettativa di vita.

"E cosa succede se non faccio nulla?" in questo caso, è opportuno informare il proprietario che l'animale avrà bisogno di un trattamento sintomatico e palliativo fintanto che riuscirà a conservare una buona qualità di vita (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019).

Il veterinario deve essere in grado di proporre le procedure diagnostiche più idonee per ciascun paziente, saper comprendere le preoccupazioni e le limitazioni dei proprietari che possono riguardare sia la sfera gestionale che quella economica. Dal lato opposto si potrebbero presentare proprietari che desiderano le migliori cure esistenti per i propri animali. In questo ultimo caso bisogna saper esporre i limiti della propria struttura ed in caso riferire il paziente a strutture che lavorano a livelli altamente specializzati.

Ulteriori approfondimenti sulla comunicazione con il proprietario e la qualità della vita sono presenti nel Capitolo 7.

3. Diagnosi e stadiazione

A seguito del sospetto diagnostico che si formula durante la visita clinica ed in base al colloquio con il proprietario si possono eseguire una serie di indagini diagnostiche atte a stabilire la tipologia tumorale presente, il grado di diffusione neoplastica sistemica ed in base a questo si effettua la stadiazione tumorale, la quale definisce un coinvolgimento limitato alla massa, esteso ai linfonodi oppure già in stadio avanzato con coinvolgimento di altri organi ed apparati.

3.1. Citopatologia

L'esame citologico mediante ago-aspirato (FNA) delle masse tumorali può essere utile nel differenziare le neoplasie mammarie da altri tipi tumorali quali lipomi o mastocitomi o da processi non neoplastici quali mastiti (Sleeckx et al., 2011). È considerata una tecnica economica e di facile esecuzione (Sleeckx et al., 2011). L'esame citologico viene inoltre utilizzato per la ricerca di cellule neoplastiche su agoaspirati linfonodali, su reazioni prossime o sulla cicatrice chirurgica per differenziare una recidiva locale del tumore da un processo infiammatorio (Levi et al., 2016). Se sono presenti masse multiple devono essere valutate individualmente in quanto possono essere presenti diverse tipologie tumorali contemporaneamente (Sorensen et al., 2009).

Storicamente l'accuratezza delle diagnosi citologiche per i tumori mammari rispetto ad altre tipologie tumorali si è dimostrata meno sensibile e meno specifica (Simon et al., 2009). Tuttavia, studi recenti stimano una corrispondenza tra diagnosi citologica ed istopatologica attorno all'80% ed una corrispondenza circa del 90% nella differenziazione tra tumori benigni e tumori maligni. Ne deriva una sensibilità ed una specificità rispettivamente dell'88% e del 96% per quanto riguarda la diagnosi di malignità (Simon et al., 2009). Prelevare un minimo di quattro campioni per massa aumenta la probabilità di campionare diverse aree dei tumori eterogenei (Simon et al., 2009).

Purtroppo, circa un 15-25% di preparati citologici risulta non adeguato e quindi non diagnostico (Simon et al., 2009; Levi et al., 2016); le cause frequenti sono ipocellularità del campione, campionamento non eseguito in modo corretto e campione non ben conservato, caratteristiche intrinseche del tumore (es: presenza di necrosi), inoltre, alcuni tipi tumorali possono portare a reattività tissutale con un'importante infiltrazione di cellule infiammatorie ed atipie cellulari (Simon et al., 2009; Levi et al., 2016). I campioni non diagnostici spesso sono lesioni benigne, questo può essere spiegato dal fatto che le

lesioni non neoplastiche e i tumori benigni hanno la tendenza ad essere meno esfoliativi rispetto ai tumori maligni (Pierini et al., 2017). Nella cagna le lesioni maligne vengono frequentemente sottostimate mediante FNA, poiché, tipicamente in questa specie, coesistono lesioni benigne adiacenti a lesioni maligne focali (Emanuelli et al., 2020). Pertanto, il responso di lesione benigna non esclude la presenza di lesioni maligne poco rappresentate e non campionate (Levi et al., 2016). Un campionamento eseguito da mani più esperte può ridurre di molto la percentuale di citologici non diagnostici (Emanuelli et al., 2020).

Una valutazione citologica pre-operatoria può quindi essere un utile strumento diagnostico, prognostico e la base per prendere decisioni terapeutiche, tuttavia, sono necessari ulteriori studi con un numero di soggetti più rappresentativo della popolazione ed esclusione di altri fattori che possono influenzare i dati precedentemente esposti; rimane ancora una sfida la differenziazione in particolar modo di tumori complessi e misti (Emanuelli et al., 2020; Simon et al., 2009).

Seppure l'accuratezza delle indagini citopatologiche sia in continuo miglioramento, il gold standard per la diagnosi di neoplasia mammaria nella cagna rimane l'esame istopatologico (Levi et al., 2016). È un esame rilevante nello stabilire l'istotipo, il grading, la prognosi e dal momento che raramente vengono eseguite biopsie precedenti alla chirurgia, è anche uno strumento per la valutazione dei margini di escissione chirurgica (Emanuelli et al., 2020).

Per quanto riguarda l'ispezione dei linfonodi al fine di stabilire il coinvolgimento metastatico o meno, l'esame istopatologico dei linfonodi regionali è la metodica raccomandata dal sistema di stadiazione WHO. Tuttavia, la valutazione in medicina veterinaria viene eseguita spesso mediante citologia del FNA essendo una metodica meno invasiva, più economica e di rapida esecuzione (Fournier et al., 2018). Uno studio prospettico datato 2001 ha stimato una sensibilità del 100% ed una specificità del 96% nell'identificare la presenza di metastasi linfonodali in presenza di diverse tipologie tumorali sia in cani che in gatti (Langenbach et al., 2001), tuttavia, sia studi precedenti che più recenti hanno rilevato percentuali inferiori a queste (Fournier et al., 2018). Inoltre, in molti casi l'esame citologico non permette di formulare una diagnosi certa ma solamente sospetti diagnostici che necessitano di ulteriori indagini mediante altre metodiche. In particolar modo, la scarsa natura esfoliativa dei sarcomi limita l'utilizzo del FNA (Fournier et al., 2018). Un altro punto a sfavore dell'analisi citologica è dato dall'alta percentuale

(25%) di preparati non diagnostici dovuti principalmente alla localizzazione profonda dei linfonodi ed al loro scarso aumento di volume in molti casi (Fournier et al., 2018; Collivignarelli et al., 2021). Seppure la citologia mediante ago-aspirato rimanga un'indagine poco invasiva, si raccomandano ulteriori indagini istopatologiche in caso di risultati negativi (Fournier et al., 2018; Langenbach et al., 2001). La valutazione istopatologica è considerata il gold standard ed in molti casi non può essere sostituita da una valutazione citologica mediante ago-aspirato (Fournier et al., 2018; Langenbach et al., 2001).

Dallo studio di Fournier emerge che l'aumento di volume linfonodale ha un'alta correlazione con la presenza di metastasi, tuttavia, un 15% dei soggetti con metastasi aveva linfonodi di dimensioni normali. Dal momento che oltre il 23% dei soggetti esaminati presentavano metastasi in multipli linfonodi (Fournier et al., 2018), è importante nuovamente ricordare che non sempre i linfonodi drenanti corrispondono ai linfonodi sentinella (Patsikas et al., 2006). Pertanto, un esclusivo campionamento anatomico dei linfonodi vicini potrebbe non essere sufficiente per una stadiazione linfonodale accurata e potrebbe non evidenziare la presenza di malattia locoregionale (Fournier et al., 2018; Rossi, Körner et al., 2018; Sorenmo et al., 2020).

3.2. Il linfonodo sentinella

La ricerca del linfonodo sentinella prevede una serie di procedure di diagnostica per immagini pre-chirurgiche e/o intra-chirurgiche che devono fornire al chirurgo le coordinate della sede anatomica in cui eseguire la ricerca del linfonodo, o meglio dei linfonodi, drenanti la neoplasia (Stefanello et al., 2021). C'è la necessità di ricercare il linfonodo sentinella con metodiche di mappatura sul singolo soggetto in seguito al riscontro, sempre più evidente, di drenaggi linfatici imprevedibili in corso di malattia oncologica nel cane (Collivignarelli et al., 2021; Stefanello et al., 2021). La mappatura del linfonodo sentinella consente di eseguire una stadiazione personalizzata del paziente sia in termini di linfocentro da indagare, che di numero di linfonodi da rimuovere (Stefanello et al., 2021).

Diverse sono le tecniche di mappatura del linfonodo sentinella testate in medicina umana e come tali applicate, sebbene ancora in una fase iniziale di sviluppo, in oncologia veterinaria. Ognuna di queste presenta vantaggi e svantaggi in termini di sensibilità della metodica, impiego di sostanze traccianti, nonché in termini di gestione e costi per i proprietari (Stefanello et al., 2021).

Linfografia con colorante vitale: i coloranti vitali comunemente utilizzati sono il blu di metilene, il blu di isosulfano e il blu patentato V. Viene inoculato il colorante in sede peritumorale e si attendono 5-10 minuti affinché avvenga il drenaggio (Stefanello et al., 2021). È una procedura economica e di facile esecuzione, tuttavia la colorazione blu del linfonodo si osserva solo dopo dissezione chirurgica. Pur confermando la corretta individuazione del linfonodo drenante non è in grado di escludere il possibile concomitante drenaggio di altri linfonodi sia nel medesimo linfocentro esplorato su base anatomica, sia in linfocentri anatomicamente e clinicamente ritenuti non prevedibili (Stefanello et al., 2021). Spesso questa tecnica viene associata a tecniche di imaging. Un utilizzo di coloranti vitali non inficia la successiva diagnosi citologica o istopatologica dei tessuti che li captano (Cassali et al., 2013).

A causa dell'elevata incidenza di reazioni anafilattiche nell'uomo in seguito all'inoculazione di coloranti vitali, ed altri possibili effetti avversi quali necrosi cutanea o lunga permanenza del colorante nel sito di inoculo, sono in atto studi per trovare un'alternativa ai coloranti vitali (Gonzaga et al., 2009). In particolare, l'emosiderina si è dimostrata una valida alternativa in base ai risultati preliminari forniti da uno studio effettuato su sei cagne; anche nella sua applicazione in concomitanza all'utilizzo della linfoscintigrafia (Gonzaga et al., 2009). In Figura n.1 è possibile vedere la differenza tra linfonodi sentinella marcati con emosiderina, con blu patentato V e linfonodi non sentinella.

Linfografia radiografica indiretta e tomografica computerizzata: inoculato in sede peritumorale un mezzo di contrasto iodato (olio etiodato o ioexolo) si acquisiscono immagini radiografiche seriali a diversi minuti di distanza che permettono la visualizzazione del percorso di drenaggio e quindi l'individuazione della prima stazione linfonodale drenante (Stefanello et al., 2021). Il mezzo di contrasto viene iniettato in quattro quadranti intorno o all'interno del tumore. L'impiego di mezzi di contrasto a base lipidica, la cui clearance è più lenta, consente l'identificazione con le tecniche di imaging per periodi più lunghi rispetto agli agenti idrosolubili (Withrow e MacEwen, 2020). Nello studio di Brissot ed Edery del 2016, questa tecnica è stata applicata a pazienti con diversi tipi tumorali, evidenziando un tasso di identificazione del 96.6%. Dal momento che i linfonodi di interesse nel 77% dei casi sono stati rimossi in un differente sito chirurgico rispetto alla neoplasia primaria, ne deriva che questa tecnica previene l'estensione del sito chirurgico del tumore rispetto a quanto accade con l'utilizzo di coloranti vitali per la necessità di tracciare il percorso di questi nei linfatici (Brissot & Edery, 2016). I lavori

eseguiti mediante linfografia TC hanno dimostrato che l'inoculazione del contrasto in quattro quadranti peritumorali fornisce una maggiore accuratezza rispetto all'inoculazione intratumorale (Randall et al., 2020). Nello studio effettuato da Soultani et al. diverse caratteristiche della linfografia indiretta con TC sono state utilizzate per stabilire o meno la presenza di metastasi nei linfonodi sentinella (Soultani et al., 2016). La presenza di un pattern di opacizzazione post-contrasto eterogeneo oppure l'assenza o la diminuzione di assunzione di mezzo di contrasto da parte dei linfonodi sono stati correlati all'invasione neoplastica (Soultani et al., 2016). Le cause che portano a queste alterazioni sono la presenza di infiltrazione neoplastica che altera l'architettura del linfonodo e quindi il flusso linfatico e la presenza di infiltrazione neoplastica nel letto vascolare che ostacola il flusso del mezzo di contrasto verso i linfonodi (Soultani et al., 2016).

Una criticità di entrambe le tecniche sta nel fatto che pur permettendo di identificare il linfocentro da esplorare, l'isolamento del linfonodo, o dei linfonodi, da rimuovere all'interno di quel linfocentro è dettato dalla sensibilità del chirurgo, ed in presenza di linfonodi non palpabili può esitare in un mancato ritrovamento (Stefanello et al., 2021). Un altro limite è legato all'esposizione radiologica sia del paziente che degli operatori; inoltre, sono state descritte reazioni locali quali eritema, gonfiore e lieve dolore nel punto di inoculo del mezzo di contrasto (Stefanello et al., 2021). È da tenere presente che l'inoculazione di mezzi di contrasto ed il loro successivo accumulo a livello linfonodale può dare una lieve alterazione delle dimensioni, forma ed ecogenicità dei linfonodi, aspetto clinicamente rilevante in caso servisse effettuare una ago-aspirato con ausilio di ecoguida (Rossi, Körner et al., 2018).

Ultrasonografia contrastografica (CEUS): il solo studio ecografico classico non è in grado di identificare i vasi linfatici afferenti e quindi i linfonodi sentinella (Stefanello et al., 2021). Per ovviare a questo si ricorre all'utilizzo di mezzo di contrasto costituito da microbolle gassose rivestite da una membrana fosfolipidica (tecnica CEUS). Come per le altre metodiche, il mezzo di contrasto viene inoculato in sede peritumorale e, quindi, drenato dal sistema linfatico (Stefanello et al., 2021). I tassi di identificazione dei linfonodi sentinella variano tra i diversi studi tra l'80% e il 95% (Favril et al., 2019; Fournier et al., 2021; Lurie et al., 2006). Il CEUS sembra avere inoltre la capacità di fermarsi al primo linfonodo e di avere solo un minimo *spill-over* verso il secondo livello linfonodale (Lurie et al., 2006). Il limite di questa tecnica è che, la sede da esplorare con la sonda per accertare l'avvenuto o meno drenaggio del contrasto viene scelta a priori, in quanto seguire il vaso

linfatico dal tumore al linfonodo comporterebbe una tricotomia estensiva (Stefanello et al., 2021). Inoltre, come accade per le altre tecniche, rimane una procedura preoperatoria che presenta il limite di non aggiungere un repere che possa aiutare il chirurgo durante la dissezione e l'isolamento dei linfonodi risultati drenanti, pertanto, potrebbe non consentire la rimozione di quei linfonodi non visibili ad occhio nudo ed eventualmente presenti nel medesimo linfocentro (Stefanello et al., 2021). Un'associazione intraoperatoria di colorante vitale potrebbe facilitarne la visualizzazione (Fournier et al., 2021).

Le applicazioni di CEUS o linfo-scintigrafia + colorante vitale in medicina umana hanno dimostrato che CEUS è in grado di identificare un numero minore di linfonodi, si pensa che questo sia dovuto al fatto che con la combinazione linfo-scintigrafia + colorante vitale ci sia un maggiore *spill-over* e quindi il contrasto vada ad interessare non solo la prima tappa linfonodale del tumore (Fournier et al., 2021). A supporto di questo il tasso di metastasi ritrovato nei linfonodi mediante CEUS è maggiore (Fournier et al., 2021). Le maggiori dimensioni delle particelle utilizzate in linfo-sonografia previene, quindi, la diffusione ai linfonodi di secondo ordine (Fournier et al., 2021).

Linfo-scintigrafia: l'indagine linfo-scintigrafica prevede una fase preoperatoria per la definizione topografica del linfonodo sentinella grazie alla linfo-scintigrafia planare con gamma camera, e una fase intra-operatoria che prevede la ricerca del SLN tramite sonda gamma che rileva la radioattività emessa dal radiofarmaco drenato e concentrato all'interno della stazione linfonodale (Stefanello et al., 2021). Come per le altre tecniche il radiofarmaco viene inoculato in sede peritumorale. Il radioisotopo più comunemente utilizzato come tracciante è il Tecnezio-99m (^{99m}Tc). Questo radioisotopo può essere inoculato come radiofarmaco quando viene coniugato in una soluzione con solfuro colloide, nanoalbumine sieriche umane o destrano (Stefanello et al., 2021).

Queste molecole si caratterizzano per una diversa grandezza; molecole di medie dimensioni (10-80 nm) consentono di raggiungere in tempi ridotti i linfonodi sentinella, limitando lo *spill-over* verso il secondo o terzo livello linfonodale (Stefanello et al., 2021). Una volta individuato il linfocentro di afferenza del tumore rimane il problema di identificare quanti e quali linfonodi di quel linfocentro siano effettivamente i linfonodi sentinella. In questo gioca un ruolo fondamentale la fase intra-operatoria che permette di guidare la dissezione e di individuare quanti linfonodi all'interno di quel linfocentro abbiano concentrato il radiofarmaco (Stefanello et al., 2021). Infatti, dopo la rimozione del primo linfonodo, il controllo con sonda del campo chirurgico permette di rilevare eventuali

stazioni sentinella aggiuntive così fino a quando la conta di radioattività non sia nulla o comunque al di sotto del 10% della conta maggiore (Stefanello et al., 2021). I tassi di rilevazione dei linfonodi sentinella forniti dagli studi più recenti variano dal 95% al 100% sia con il solo utilizzo della tecnica linfoscintigrafica che con l'associazione intraoperatoria di colorante vitale (Manfredi et al., 2021; Randall et al., 2020; Worley, 2014). Tassi inferiori sono stati associati alla presenza di casi in cui una precedente chirurgia nella sede del tumore primario o lungo il drenaggio linfatico ha alterato il circolo linfatico (Stefanello et al., 2021). Nessuno studio riporta effetti collaterali locali o sistemici legati alla procedura linfoscintigrafica. Tale tecnica presenta una forte limitazione in campo veterinario, dettata dalla necessità di autorizzazione alla detenzione del radiofarmaco e dai costi della strumentazione necessaria (Stefanello et al., 2021). Inoltre, si aggiunge la necessità di formare il personale sull'uso corretto e sicuro del radiofarmaco come anche sulla corretta gestione del paziente e dei campioni sottoposti a tale procedura, sebbene il dosaggio delle radiazioni sia comunque ridotto tanto che non si necessita dell'utilizzo di camici protettivi durante la procedura chirurgica (Beer et al., 2018).

Fluorescenza (NIR – Near-Infrared Imaging): questa tecnica permetta la visualizzazione diretta intraoperatoria dei vasi linfatici ed il riconoscimento dei linfonodi sentinella; i tassi di identificazione sono sovrapponibili alla tecnica linfoscintigrafica (Stefanello et al. 2021). Sono disponibili diverse sonde e diversi coloranti fluorescenti. Quello più utilizzato in umana e testato, anche se limitato a pochi studi, in medicina veterinaria è il verde indiocianina (ICG) (Stefanello et al., 2021). La soluzione di ICG viene come sempre inoculata in sede peritumorale; successivamente tramite la sonda che emette luce con frequenza vicina agli infrarossi (pari a 780 nm), viene permessa la visualizzazione transcutanea del tracciante all'interno dei vasi e infine nel linfonodo sentinella attraverso la trasduzione del segnale ad una schermata video (Beer et al., 2018). In medicina umana è riportato in molti studi un maggior numero di linfonodi identificati dal NIR rispetto alla linfoscintigrafia, probabilmente questo è dovuto alle dimensioni più ridotte delle particelle del NIR che possono andare ad evidenziare anche il secondo livello di linfonodi drenanti (Stefanello et al., 2021). In un lavoro il NIR è stato testato in cani sani prendendo in considerazione la somministrazione a livello mammario e a livello digitale (Favril et al., 2019). L'identificazione dei linfonodi sentinella è avvenuta nella quasi totalità dei soggetti testati. L'intervallo di identificazione variava da 2 a 25 minuti post-inoculazione ed il segnale fluorescente permaneva a livello linfonodale per altre 2 ore (Favril et al., 2019). Lo

svantaggio dell'uso del NIR include la bassa profondità di penetrazione che rende impossibile evidenziare la fluorescenza oltre pochi centimetri (generalmente non oltre 2.5 cm con segnale che si riduce man mano che ci si approfondisce) (Stefanello et al., 2021). È bene quindi che questa tecnica intra-operatoria sia associata ad una valutazione preoperatoria che permetta la corretta individuazione del linfocentro da analizzare, in modo da consentire l'analisi anche per i linfocentri non superficiali (es linfocentro iliaco o linfonodi superficiali in cani di grossa taglia o obesi) (Stefanello et al., 2021). Altro aspetto da tenere in considerazione nella sua applicazione clinica è che il costo della strumentazione necessaria a rilevare la fluorescenza è da considerarsi rilevante (Stefanello et al., 2021).

La linfoscintigrafia, la tecnica NIR e i coloranti vitali offrono il vantaggio di fornire una guida chirurgica intraoperatoria durante l'escissione linfonodale (Stefanello et al., 2021). In medicina umana la tecnica attualmente considerata il gold standard per l'individuazione dei linfonodi sentinella è la linfoscintigrafia abbinata all'uso intraoperatorio di colorante vitale (Beer et al., 2018). Tuttavia, il costo e la laboriosa gestione di questa procedura la rende di difficile applicazione in ambito veterinario. Ad oggi non ci sono tecniche considerate il gold standard negli animali da compagnia (Favril et al., 2019). Studi preliminari per quanto riguarda la tecnica NIR, di più facile esecuzione rispetto alla linfoscintigrafia, in associazione a colorante vitale, sono promettenti per una futura più ampia incorporazione in oncologia veterinaria (Favril et al., 2019).

La linfografia indiretta abbinata a radiologia o TC è probabilmente la metodica più sfruttata al momento in oncologia veterinaria per individuare i linfonodi sentinella (Marconato & Foglia, 2021). L'utilizzo combinato di due tecniche (es linfografia indiretta/linfoscintigrafia + colorante vitale) migliora il tasso di individuazione dei SLN (Marconato & Foglia, 2021). La percentuale di identificazione dei linfonodi è alta, mentre non è possibile stabilire sulla base delle caratteristiche se sono, o meno, presenti metastasi. È prevista quindi linfadenectomia con successivo esame istopatologico una volta individuato il SLN (Marconato & Foglia, 2021). Fermo restando che tutti gli sforzi devono essere incanalati nell'identificare il linfonodo sentinella, in assenza di disponibilità di tecniche per identificare quest'ultimo, è fondamentale quanto meno valutare i linfonodi regionali (Marconato & Foglia, 2021).

L'elastosonografia è una nuova metodica ecografica che fornisce informazioni sulla durezza tissutale (Marconato & Foglia, 2021). La compressione del tessuto esaminato da

parte della sonda produce una distorsione, che è minore nei tessuti duri e maggiore nei tessuti più morbidi. Dal momento che le lesioni tumorali hanno una durezza maggiore rispetto alle lesioni benigne, l'elastosonografia aiuta nella distinzione (Marconato & Foglia, 2021). In oncologia umana, tale tecnica complementare viene utilizzata per evitare biopsie nodali non necessarie. In medicina veterinaria sono stati pubblicati soltanto due studi, con risultati promettenti ma ancora molto preliminari (Marconato & Foglia, 2021).

Nella Tabella n. 2 si riporta una schematizzazione delle tecniche di mappatura del linfonodo sentinella disponibili in oncologia veterinaria.

3.3. Diagnostica per immagini

La diagnostica per immagini è essenziale nella diagnosi, nella stadiazione e nella valutazione della risposta alla terapia del paziente oncologico. La scelta sull'indagine da eseguire dipende dalla disponibilità ed ogni tecnica è caratterizzata da vantaggi e svantaggi legati ai costi, alla sensibilità e alla specificità.

Data la diffusione, disponibilità e i costi relativamente bassi, uno studio radiografico del torace viene fatto con lo scopo di valutare la presenza di metastasi a livello polmonare (Sleeckx et al., 2011). L'atelettasia polmonare dovuta al posizionamento può portare a sottostimare alcune lesioni, pertanto, è opportuno eseguire gli studi radiografici in tre proiezioni (ventro-dorsale, latero-laterale destra e latero-laterale sinistra) (Nykamp e Randall, 2020). Quando si utilizzano solo due proiezioni la diagnosi cambia nel 12-15% dei casi (Nykamp e Randall, 2020). Le lesioni metastatiche a livello toracico appaiono di solito come aree circolari ben definite a maggior radiopacità, ma è comunque possibile rilevare noduli di aspetto meno definito o versamento pleurico senza alcun segno evidente a livello polmonare (Otoni et al., 2010). Lesioni inferiori ai 5-7 mm non sono visibili all'indagine radiografica (Sleeckx et al., 2011). Maggiore sensibilità si ha mediante la tomografia computerizzata (TC) che può rilevare lesioni fino ad 1 mm di diametro (Cassali et al., 2014; Otoni et al., 2010; Sleeckx et al., 2011). Inoltre, per la valutazione di patologie toraciche non cardiache la TC fornisce maggiori informazioni su presenza, localizzazione ed estensione delle lesioni rispetto alla semplice indagine radiografica (Otoni et al., 2010). In medicina veterinaria la TC viene ancora effettuata con il paziente in anestesia generale, ma con la crescente disponibilità di apparecchi TC multistrato più esami tomografici vengono eseguiti con pazienti sedati (Nykamp e Randall, 2020). Vi sono dei vantaggi evidenti in termini di velocità e di costi quando si eseguono esami su pazienti non in

anestesia, tuttavia, la possibilità che si verifichi l'atelettasia polmonare è sempre da considerare e ciò può inficiare l'interpretazione della TC toracica (Nykamp e Randall, 2020). Seppur le indagini mediante TC della cavità toracica costituiscano un sistema più sensibile nel rilevare noduli polmonari rispetto allo studio radiografico, questa tecnica rimane limitata dal fatto che è una tecnica più costosa e con disponibilità limitata. La radiologia convenzionale, quindi, continuerà ad avere un ruolo fondamentale come test di *screening* iniziale e può fornire prove della presenza di una massa la cui origine potrà poi essere meglio identificata tramite ecografia, TC o risonanza magnetica (RM).

I polmoni sono uno dei principali siti di metastasi delle neoplasie mammarie, tuttavia, si consiglia di effettuare anche un'indagine ecografica addominale al fine di rilevare altri siti di metastasi (Cassali et al., 2013). L'ecografia addominale può essere indicata anche nei cani con sospetto coinvolgimento regionale dei linfonodi o quando agli esami del sangue preoperatori vengono rilevate alterazioni dei valori che suggeriscono cambiamenti biochimici sierici correlati o non correlati al tumore (Sorenmo et al., 2020). Tuttavia, la sensibilità dell'imaging nel differenziare tra linfonodo normale e metastatico è ancora bassa, in particolare in presenza di coinvolgimento micrometastatico, pertanto, è necessario ricorrere alla linfadenectomia con valutazione istopatologica (Marconato e Foglia, 2021).

La TC e l'RM permettono una migliore visualizzazione di addomi grandi, masse molto estese o complesse, masse di origine sconosciuta e aree difficili da esaminare con l'ecografia come il settore cranio-dorsale dell'addome, la pelvi e lo spazio retroperitoneale (Nykamp e Randall, 2020). Secondo gli studi effettuati da Feliciano et al. (2012) l'indagine ecografica convenzionale non mostra la presenza di caratteristiche che possano differenziare tumori benigni da quelli maligni in termini di regolarità dei margini ed *ecotexture*. Questi dati sono in disaccordo con studi precedenti che affermavano presenza di margini regolari ed *ecotexture* omogenea nei tumori benigni ed il contrario in quelli maligni (Feliciano et al., 2012). Il motivo di questo può essere spiegato dall'utilizzo di sonde ecografiche a più alta risoluzione. Ne deriva che la visualizzazione di aree cistiche o foci iperecogeni non sono ritrovamenti utili per differenziare le neoplasie (Feliciano et al., 2012). Utilizzando il *Doppler mode* non si notano differenze nella vascolarizzazione tra tumori maligni e benigni. Tuttavia, le caratteristiche del flusso, in particolare alti valori di velocità di picco sistolico, sembrano correlate alla malignità (Feliciano et al., 2012). Il limite di questo dato sta nel fatto che in circa il 50% delle neoplasie non è possibile visualizzare

la vascolarizzazione (Feliciano et al., 2012). L'ecografia con mezzo di contrasto permette di individuare i vasi ematici più piccoli in modo migliore rispetto alle immagini Doppler grazie a minori artefatti da movimento (Feliciano et al., 2017). L'elastografia è una tecnica che utilizza gli ultrasuoni per valutare la durezza relativa dei tessuti. Questa metodica ha dimostrato una buona efficacia nel differenziare lesioni benigne da quelle maligne e la sua futura inclusione in ambito veterinario potrebbe apportare importanti informazioni e contribuire ad un approccio chirurgico più adatto al singolo caso dal momento che i risultati istopatologici spesso seguono l'escissione del tumore (Feliciano et al., 2017).

3.4. Istopatologia ed immunoistochimica

Sebbene diversi segni clinici quali rapida crescita, dimensioni del tumore, ulcerazioni, grado di fissazione alla cute ed ai tessuti sottostanti, possano essere fattori tendenzialmente di malignità (Cassali et al., 2014) spesso risulta impossibile distinguere neoplasie benigne da quelle maligne soltanto su base clinica. L'analisi istopatologica è considerata il gold standard per la diagnosi del tipo tumorale e la differenziazione tra benigni e maligni (Goldschmidt et al., 2017).

Allo stesso modo l'esame istopatologico del linfonodo è il gold standard per accertarne il coinvolgimento metastatico (Stefanello et al., 2021). Affinchè il patologo possa esaminare tutta la struttura dell'organo, il linfonodo deve essere asportato in toto (linfadenectomia), avendo particolare cura nel non danneggiare la capsula (Marconato & Foglia, 2021). Inoltre, se il linfonodo risulta macroscopicamente alterato, è altresì importante asportare il grasso perinodale per la valutazione istopatologica (Marconato & Foglia, 2021).

La biopsia incisionale del linfonodo non è pertanto indicata, perché non consente di individuare gruppi isolati di cellule neoplastiche (< 0.2 mm), micrometastasi (0.2-2 mm) e, in alcuni casi, anche macrometastasi (> 2 mm) (Marconato & Foglia, 2021). In caso di campioni negativi per metastasi un ulteriore ausilio diagnostico può essere fornito dall'immunoistochimica del materiale linfonodale (Marconato & Foglia, 2021). Tale tecnica si basa sull'utilizzo di specifici anticorpi verso proteine espresse dalle cellule tumorali come alcune citocheratine (Cassali et al., 2013).

In caso di noduli multipli, spesso sono associati tumori benigni e maligni in base alla teoria del continuum esposta da Sorensen; pertanto è necessario eseguire l'esame istologico di tutti le masse rilevate per una buona diagnostica (Sorensen et al., 2009).

Nel 2011 l'American College of Veterinary Pathologists, insieme a diversi oncologi medici e chirurgici, ha pubblicato una serie completa di raccomandazioni e linee guida per l'invio,

il taglio, la valutazione dei margini e il report di campioni bioptici di tumori (Kamstock et al., 2011). Questo documento rappresenta il primo tentativo di standardizzare i report delle patologie oncologiche in medicina veterinaria, affidarsi a laboratori che aderiscono a queste linee guida permette di ottenere risultati standardizzabili e più facili da interpretare (Whitrow e MacEwen, 2020). I principali problemi che possono inficiare una diagnosi istopatologica sono il conferimento di campioni non rappresentativi la lesione, modalità di fissazione inadeguate e assenza di informazioni relative al campione (Cassali et al., 2013). Dopo il campionamento i prelievi devono essere posti il più rapidamente possibile in adeguata quantità di formalina al 10% per la fissazione, al massimo entro 30 minuti dall'escissione, e spediti al laboratorio entro 24 ore per la processazione (Cassali et al., 2014; Kamstock et al., 2011). Il volume della soluzione deve essere 10 volte quello del campione ed il tempo di fissazione non deve superare le 24-48 ore (Cassali et al., 2014). I contenitori per l'invio dei campioni sono solitamente forniti dai laboratori di riferimento, si raccomanda l'utilizzo di contenitori di dimensioni adeguate al campione prelevato in quanto il tessuto indurito dopo la fissazione deve essere facilmente estraibile dal contenitore (Kamstock et al., 2011).

I campioni posti nei contenitori appositi devono essere contrassegnati in modo univoco ed accuratamente chiusi per evitare perdite di liquido (la formalina è una sostanza cancerogena ed altamente tossica) (clinicaveterinarianasanmarco.it).

In caso di campioni multipli si suggerisce di inviare i campioni in barattoli separati, per facilitare la loro identificazione, altrimenti distinguerli ad esempio con fili da sutura (Whitrow e MacEwen; 2020). Nella richiesta specificare il numero di campioni inviati. In caso di campioni di grandi dimensioni può risultare difficile spedire in toto il tessuto da esaminare. In questo caso quindi, il campione può essere pre-fissato dal veterinario, eventualmente in seguito ad incisioni per facilitare il processo di fissazione, avvolto in garze immerse in formalina ed inserito in uno o più contenitori idonei (clinicaveterinarianasanmarco.it). In alternativa, se le lesioni sono chiaramente identificabili, è possibile inviare solo porzioni della massa, assicurandosi di includere diverse aree, comprese quelle di interfaccia con il tessuto normale. Tuttavia, vista l'eterogeneità delle neoplasie mammarie è consigliabile che sia il patologo a campionare la lesione (Whitrow e MacEwen, 2020). Per una corretta valutazione dei margini è utile un orientamento del campione da parte del chirurgo mediante apposizione di punti di sutura in una posizione nota o mediante l'utilizzo di coloranti specifici (clinicaveterinarianasanmarco.it).

Il modulo di invio del campione è solitamente fornito dal laboratorio ed è il mezzo di comunicazione tra i clinici, il personale di laboratorio ed i patologi. I dati forniti da questo modulo sono indispensabili per una corretta interpretazione del campione istologico e comprendono: segnalamento del paziente (età, sesso, stato riproduttivo, razza), precisa localizzazione della lesione, descrizione macroscopica della lesione, tipologia di campionamento (biopsia incisionale vs escissionale), storia clinica del paziente in relazione alla lesione esaminata, storia clinica del paziente in relazione a precedenti lesioni neoplastiche o condizioni rilevanti concomitanti (Cassali et al., 2014; Kamstock et al., 2011).

Il profilo di espressione genica è considerato il *gold standard* per l'identificazione dei sottotipi di cancro al seno nella donna, ma è poco pratico per l'applicazione nella routine clinica e per l'utilizzo su campioni di tessuto inclusi in paraffina (Levi et al., 2016). Per questo è stato proposto l'uso di un pannello di marcatori immunoistochimici (Levi et al., 2016). L'analisi immunoistochimica può essere utilizzata in supporto all'esame istopatologico consentendo una classificazione più precisa e fornendo informazioni prognostiche aggiuntive (Rasotto et al., 2014).

L'esame immunoistochimico viene effettuato su sezioni istologiche prelevate dallo stesso blocchetto sottoposto da esame istologico (Levi et al., 2016). Dal momento che i tumori mammari canini sono caratterizzati da un'ampia variabilità vedendo coinvolti diversi tipi cellulari, epiteliali luminali, mioepiteliali e mesenchimali; per interpretare correttamente i marcatori di differenziazione cellulare espressi dai diversi tipi tumorali è fondamentale conoscere quelli espressi in condizioni di normalità dalle popolazioni cellulari presenti nella ghiandola mammaria (Rasotto et al., 2014).

Tra questi marcatori possiamo trovare le citocheratine (CK), filamenti intermedi che compongono il citoscheletro delle cellule epiteliali (Peña et al., 2014). Le cellule dell'epitelio luminale sono caratterizzate dall'espressione di determinate citocheratine, tra cui CK7, CK8, CK18 e CK19. Le cellule basali/mioepiteliali invece esprimono le CK5, CK6, CK14 e CK17 (Peña et al., 2014). Le cellule mioepiteliali in aggiunta esprimono altri *markers*, tra i principali troviamo p63, vimentina (VIM), calponina (CALP) e actina della muscolatura liscia (SMA) (Peña et al., 2014).

Tuttavia, le sottopopolazioni cellulari della ghiandola mammaria sono molto più complesse di così. Mediante analisi immunoistochimica delle normali ghiandole mammarie nella cagna sono state identificate cinque sottopopolazioni:

- Cellule progenitrici (CK5+, CK14+, p63+, and VIM+)
- Cellule mioepiteliali intermedie (CK5+, CK14+, p63+, SMA+, CALP+, and VIM+)
- Cellule mioepiteliali differenziate terminali (CALP+, SMA+, and VIM+)
- Cellule luminali ghiandolari intermedie (CK5+, CK14+, and CK8/CK18+)
- Cellule luminali ghiandolari differenziate terminali (CK8/CK18+)

(Rasotto et al., 2014)

Durante la carcinogenesi mammaria i markers di differenziazione cellulare solitamente sono mantenuti, questo permette il loro utilizzo a scopo diagnostico (Rasotto et al., 2014). A differenza di CALP e SMA che vengono espresse anche da miofibroblasti e cellule muscolari lisce vasali, p63 non viene espresso da questi tipi cellulari. Per questo motivo assume una maggiore sensibilità e specificità come marker mioepiteliale (Peña et al., 2014). Le cellule mioepiteliali neoplastiche nei carcinomi complessi in alcune aree tendono ad esprimere un fenotipo puramente mesenchimale mostrando una positività solo per VIM (e non per CALP ed SMA). Questo aspetto rinforza l'ipotesi sull'origine degli elementi mesenchimali (cartilagine ed osso) nei tumori misti della cagna spiegato attraverso un cambiamento metaplasico delle cellule mioepiteliali verso il tessuto mesenchimale (Rasotto et al., 2014). In aggiunta, la presenza di marker indicativi di minor differenziazione mioepiteliale possono essere associati ad una maggior aggressività tumorale (Rasotto et al., 2014). Le cellule mioepiteliali differenziate sembrano avere un ruolo nella soppressione tumorale in quanto inibiscono la crescita delle cellule tumorali, l'invasione e l'angiogenesi, per questo motivo può essere utile determinare la presenza di markers che identificano la componente mioepiteliale (Sorenmo et al., 2011). Questi sono solo alcuni degli aspetti indagabili mediante analisi immunoistochimica che possono essere utili per la formulazione di una prognosi più accurata. Molti altri sono gli aspetti da indagare per determinare il ruolo che hanno le cellule mioepiteliali nella loro azione come soppressori o promotori della progressione dei tumori mammari canini. Ne deriva la necessità dell'utilizzo di protocolli diagnostici standardizzati e l'indagine su più ampi gruppi di animali per comparare i risultati dei vari autori (Peña et al., 2014; Rasotto et al., 2014). Altri markers identificabili mediante analisi immunoistochimica sono il recettore 2 per il fattore di crescita epidermico (HER-2), il recettore per gli estrogeni (ER) ed il recettore per il progesterone (PR) (Peña et al., 2014; Rasotto et al., 2014).

La sovraespressione di HER-2 nei tumori maligni ha prodotto percentuali molto variabili tra i diversi autori, probabilmente per l'assenza di protocolli diagnostici standard tra i vari studi, non offrendo quindi un consenso sul suo valore prognostico (Peña et al., 2014).

Anche gli studi sui ER e PR forniscono risultati discordanti ma tutti gli autori concordano che questi recettori sono espressi in quantità minore nei tumori mammari maligni, infatti essi diminuiscono all'aumentare delle dimensioni del tumore e al diminuire della differenziazione (Mainenti et al., 2014; Peña et al., 2014; Rasotto et al., 2014). L'espressione dei recettori ormonali è influenzata inoltre dall'età e dallo stato ormonale della cagna. Le femmine intere, giovani ed in estro hanno maggiori probabilità di avere tumori recettore-positivi rispetto alle femmine sterilizzate, più anziane ed in anestro (Mainenti et al., 2014; Peña et al., 2014).

Una delle cause principali di impossibilità della standardizzazione dei risultati tra i vari studi risiede nella mancanza di definizione di una soglia biologica di positività agli ER e PR, ossia una percentuale di ER e PR che assicuri la risposta alla terapia ormonale (Peña et al., 2014).

Dallo studio precedentemente esposto di Kristiansen emergeva un beneficio nel sottoporre ad ovarioisterectomia cagne con tumori benigni al momento della rimozione del tumore (Kristiansen et al., 2016). Si è visto che i tumori maligni spesso sono ER negativi, quindi, la privazione dello stimolo ormonale non apporta benefici attraverso l'interazione con i recettori degli estrogeni (Sorenmo et al., 2019). Tuttavia, sembra che in alcuni di questi tumori alti livelli di estrogeni prevengano lo sviluppo di metastasi attraverso meccanismi non mediati dai recettori (Sorenmo et al., 2019). Ne deriva che la sterilizzazione in soggetti con alti livelli sierici di estrogeni e neoplasie ER negative possa essere dannosa (Sorenmo et al., 2019). Studi su una popolazione più ampia sono necessari per chiarire queste ipotesi.

Un ultimo aspetto che verrà trattato riguardante l'analisi immunoistochimica è relativo all'attività proliferativa delle cellule tumorali. Generalmente viene impiegato un anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene Ki-67 (Klopfleisch et al., 2011). Il Ki-67 è una proteina espressa nei nuclei delle cellule ciclanti, mentre è assente nelle cellule a riposo (Klopfleisch et al., 2011). Nel cane è stata rilevata una maggior espressione di Ki-67 nei tumori mammari maligni rispetto alle iperplasie/tumori benigni (Klopfleisch et al., 2011). Elevati livelli di Ki-67 si riscontrano in tumori mammari di elevate dimensioni, con tendenza alla metastatizzazione e associati a tempi di sopravvivenza brevi (Klopfleisch et al., 2011).

3.5. Stadiazione

I tumori mammari canini sono sottoposti a stadiazione secondo il sistema TNM (tumore, linfonodi, metastasi) (Sorenmo et al., 2011). Una versione modificata del sistema di stadiazione originale WHO pubblicato da Owen (1980) è attualmente utilizzata dalla maggior parte degli oncologi. La versione modificata prevede la stadiazione sulla base di cinque categorie (Sorenmo et al., 2011).

Lo stadio della patologia permette di definire l'estensione tumorale, di conseguenza questo permette di stabilire una prognosi e pianificare il trattamento. La progressione delle dimensioni del tumore (T) corrisponde ad un avanzamento dello stadio clinico da I a III. Nel caso fossero presenti più masse neoplastiche la stadiazione si esegue valutando la neoplasia maligna con dimensioni maggiori (Sorenmo et al., 2011). Le metastasi linfonodali (N) determinano un passaggio della malattia al IV stadio, indipendentemente dalle dimensioni del tumore, mentre le metastasi (M) a distanza costituiscono la malattia allo stadio V (Cassali et al., 2013; Sorenmo et al., 2011).

Tabella n. 3 – Stadiazione TNM dei tumori mammari epiteliali nel cane (WHO modificato secondo MacEwen e Withrow 1996).

Stadio	Dimensione del tumore (T)	Stato linfonodale (N)	Metastasi (M)
Stadio I	T ₁ <3 cm	N ₀	M ₀
Stadio II	T ₂ 3-5 cm	N ₀	M ₀
Stadio III	T ₃ >5 cm	N ₀	M ₀
Stadio IV	qualsiasi T	N ₁ (positivo)	M ₀
Stadio V	qualsiasi T	qualsiasi N	M ₁ (metastasi)

Oltre a facilitare la comunicazione tra colleghi, la stadiazione delle neoplasie mammarie permette anche di comparare pazienti con aspetti tumorali simili e quindi valutare l'efficacia di nuovi approcci terapeutici (Cassali et al., 2014).

4. Classificazione e grading

4.1. Classificazione su base istopatologica

La finalità della classificazione istologica non è solo quella di inquadrare le neoplasie in una delle tipologie note, ma anche di fornire al clinico informazioni utili sulla prognosi; infatti, il sistema di classificazione istopatologica attribuisce alle diverse forme neoplastiche un comportamento biologico specifico (Levi et al, 2016).

Nella mammella sono presenti diverse popolazioni cellulari, sia epiteliali che mesenchimali, e ciascuna di esse può potenzialmente originare un tumore (Levi et al, 2016). A livello di dotti e lobuli possiamo distinguere un epitelio secernente o luminale ed un epitelio basale o mioepitelio; queste componenti possono proliferare congiuntamente caratterizzando i tumori complessi, oppure singolarmente, come avviene nei tumori semplici. Una proliferazione concomitante della componente epiteliale e mesenchimale dà luogo a tumori misti (Levi et al, 2016).

Nei tumori complessi si è ipotizzato che la componente mioepiteliale influenzi il comportamento biologico del tumore, inibendo la replicazione, l'invasione e l'angiogenesi delle cellule epiteliali luminali tumorali (Sorensen et al., 2011). Pertanto, tali neoplasie avrebbero un comportamento biologico meno aggressivo rispetto alle altre forme tumorali c.d. semplici (Sorensen et al., 2011). Quindi un tumore complesso è meno aggressivo di uno semplice perché le cellule di un tipo cellulare ostacolano la crescita dell'altro, limitando a vicenda la crescita complessiva della massa.

In letteratura sono stati proposti differenti metodi di classificazione dei tumori mammari su base istologica, a partire dalla classificazione della WHO del 1974 e successive modificazioni da parte di Misdorp et al. (1999). Ad oggi il più recente e diffuso sistema classificativo riguardante i tumori mammari nella cagna è quello pubblicato da Goldschmidt et al. nel 2011. La classificazione proposta da Goldschmidt offre una descrizione più dettagliata di alcuni tumori benigni ed una maggior suddivisione dei tumori maligni (Canadas et al., 2019).

Tabella n. 4 – Classificazione istologica delle displasie e neoplasie mammarie della cagna (Goldschmidt et al., 2011):

Iperplasie/displasie mammarie
Ectasia duttale Iperplasia lobulare (adenosi) • Regolare • Con attività secernente (lattazionale) • Con fibrosi (tessuto connettivo fibroso interlobulare) • Con atipia Epiteliosi Papillomatosi Alterazione fibroadenomatosa Ginecomastia
Neoplasie benigne
Adenoma semplice Adenoma papillare intraduttale (papilloma del dotto) Adenoma duttale (adenoma basaloide) Fibroadenoma Mioepitelioma Adenoma complesso (adenomioepitelioma) Tumore misto benigno
Neoplasie epiteliali maligne – carcinomi
Carcinoma in situ Carcinoma semplice • Tubulare • Tubulo-papillare • Cistico-papillare • Cribriforme Carcinoma invasivo micropapillare Carcinoma solido Comedocarcinoma Carcinoma anaplastico Carcinoma che insorge in un adenoma complesso/tumore misto (la controparte benigna è evidente) Carcinoma complesso (la componente epiteliale maligna e mioepiteliale benigna) Carcinoma e mioepitelioma maligno (entrambe le componenti sono maligne) Carcinoma misto Carcinoma duttale Carcinoma papillare intraduttale

Neoplasie epiteliali maligne – tipi speciali
Carcinoma squamocellulare Carcinoma adenosquamoso Carcinoma mucinoso Carcinoma ricco di lipidi (secretorio) Carcinomi a cellule fusate • Mioepitelioma maligno • Carcinoma squamoso variante a cellule fusate • Carcinoma variante a cellule fusate Carcinoma infiammatorio
Neoplasie mesenchimali maligne – sarcomi
Osteosarcoma Condrosarcoma Fibrosarcoma Emangiosarcoma Altri sarcomi
Tumori mammari misti maligni
Carcinosarcoma
Neoplasie del capezzolo
Adenoma Carcinoma Carcinoma con infiltrazione epidermica (<i>Paget-like disease</i>)
Iperplasia/displasia del capezzolo
Melanosi della pelle del capezzolo

I tumori mammari maligni mesenchimali (sarcomi) sono meno frequenti dei carcinomi. Comprendono meno del 5% di tutti i tumori mammari e meno del 13% di tutti i tumori mammari maligni (Sleeckx et al., 2011). Tra i più frequenti ci sono il fibrosarcoma e l'osteosarcoma, occasionalmente si possono trovare condrosarcomi e liposarcomi (Sleeckx et al., 2011).

Per una descrizione dei singoli tipi tumorali secondo Goldschmidt et al. (2011) si fa riferimento all'appendice.

4.2. Grading

I tumori mammari epiteliali maligni (carcinomi) vengono sottoposti ad un grading istopatologico per fornire importanti informazioni prognostiche ai clinici. Esso potenzia le informazioni già fornite dal patologo al clinico tramite la classificazione istologica morfologica, non la sostituisce ma la completa (Levi et al, 2016). Tumori con un grading più alto hanno prognosi peggiori (Sleeckx et al., 2011). Differenti sistemi di grading sono utilizzati in medicina veterinaria, la maggior parte dei sistemi proposti per gli animali domestici proviene dalla medicina umana e si basa sull'applicazione del metodo di Elston ed Ellis del 1991 (Elston ed Ellis, 1991; Goldschmidt et al., 2011). I sistemi più diffusi sono quelli di Misdorp e di Peña (Misdorp, 2002; Peña et al., 2012). Secondo una recente indagine quello di Peña si è dimostrato avere il miglior valore predittivo in quanto considera l'eterogeneità delle neoplasie della cagna dando indicazioni su come considerare la parte mioepiteliale e descrive meglio come valutare il pleomorfismo nucleare (Peña et al., 2012; Levi et al., 2016).

I criteri presi in considerazione sono: formazione di tubuli, pleomorfismo nucleare, mitosi per 10 campi ad alto ingrandimento (HPF). Ogni criterio viene valutato mediante una scala da 1 a 3 (Peña et al., 2012). Nella seguente tabella vengono riassunti i parametri utilizzati per stabilire il punteggio dei vari criteri.

Tabella n. 5 – Criteri per il grading istologico di malignità secondo il sistema di Peña (Peña et al., 2012)

Punteggio	Formazione di tubuli	Pleomorfismo nucleare	Mitosi per 10 HPF
1 punto	Formazione di tubuli per più del 75% del campione	Nucleo piccolo omogeneo o regolare e nucleoli occasionali	0-9
2 punti	Moderata formazione di strutture tubulari (10-75% del campione) associata ad aree di crescita tumorale solida	Grado moderato di variazione della grandezza e della forma nucleare, nucleo ipercromatico e presenza di nucleoli (alcuni dei quali possono essere prominenti)	10-19
3 punti	Formazione di tubuli minima o assente (< 10%)	Marcata variazione nella grandezza nucleare e nell'ipercromasia nucleare spesso con uno o più nucleoli prominenti	> 20

Il punteggio totale viene poi convertito nel grado di malignità come mostrato in Tabella n.6.

Tabella n. 6 – Grado del tumore basato sul punteggio istologico (Peña et al., 2012).

Punteggio totale	Grado di malignità
Da 3 a 5	I (basso), ben differenziato
Da 6 a 7	II (intermedio), moderatamente differenziato
Da 8 a 9	III (elevato), scarsamente differenziato

4.3. Classificazione su base molecolare

La classificazione su base molecolare dei tumori mammari nella donna si basa sull'individuazione mediante analisi immunoistochimica di diversi markers. In particolare, vengono ricercati i recettori estrogenici (ER), recettori del progesterone (PR), recettore 2 del fattore di crescita epidermico (HER-2), il marker di proliferazione cellulare Ki-67 e i markers di differenziazione delle cellule basali e luminali (Valdivia et al., 2021). La classificazione molecolare nella donna comprende i seguenti sottotipi tumorali:

- Luminale A (alto HR, HER-2 -, basso Ki-67, marker luminali + e marker basali +/-)
- Luminale B (basso HR, HER-2 +/-, Ki-67 alto/qualsiasi livello, marker luminali + e basali +/-)
- Sovraesprimente HER-2 (HR -, HER-2 +, qualsiasi livello di Ki-67, marker luminali e basali +/-)
- Triplo negativo (HR -, HER-2 -, qualsiasi livello di Ki-67, marker luminali e basali +/-)

Ai diversi sottotipi corrispondono prognosi differenti, andando da una prognosi più favorevole per i luminali A ed infausta per i tripli negativi (Sorenmo et al., 2020).

L'importanza di poter applicare tale nuovo sistema classificativo su base molecolare nelle neoplasie mammarie in medicina veterinaria trova un duplice riscontro: primo, il possibile ruolo che ogni sottotipo assumerebbe come indicatore prognostico; secondo, aprirebbe la strada ad un trattamento terapeutico mirato (Levi et al., 2016). Diversi autori hanno cercato di stabilire una classificazione molecolare dei tumori mammari canini sulla base dei markers utilizzati in umana, tuttavia, i risultati tra i vari studi differiscono (Sorenmo et al., 2020). È necessario, quindi, proseguire le ricerche mediante l'utilizzo di protocolli standardizzati di analisi immunoistochimica in modo da rendere i risultati dei vari studi comparabili (Sorenmo et al., 2020).

5. Trattamento

5.1. Chirurgia

L'escissione chirurgica è il trattamento d'elezione per tutti i tumori della mammella, eccetto per il carcinoma infiammatorio e per pazienti in stadio V metastatico (Fossum et al., 2019; Valdivia et al., 2021). L'asportazione permette di ottenere la diagnosi istologica, può essere risolutiva e può migliorare la qualità della vita oppure modificare la progressione della malattia (Fossum et al., 2019). La scelta della tecnica chirurgica da impiegare per la rimozione del tumore e di una quantità variabile di tessuto mammario dipende dalla dimensione del tumore, dalla sua localizzazione e consistenza, dalle condizioni del paziente e dalle preferenze del chirurgo (Fossum et al., 2019). La mancanza di evidenze cliniche prospettiche uniformi rende difficoltoso formulare raccomandazioni in merito all'estensione dell'escissione chirurgica (Sorenmo et al., 2020). L'obiettivo dell'intervento deve essere definito attraverso la stadiazione e la consulenza con il proprietario. Gli obiettivi possono essere rimuovere le neoplasie con margini puliti oppure alla rimozione associare la prevenzione di nuovi tumori alle ghiandole rimanenti. Quest'ultima opzione richiederebbe la mastectomia a scopo profilattico delle ghiandole clinicamente normali oltre a quella delle ghiandole colpite (Sorenmo et al., 2020). L'escissione incompleta o le procedure citoriduttive non sono raccomandate (Sorenmo et al., 2020).

Gli approcci chirurgici applicabili alle neoplasie mammarie a seconda del caso possono essere:

- **Nodulectomia semplice:** escissione di una massa e di un margine circostante di tessuto mammario macroscopicamente normale (ampiezza maggiore o uguale a 1 cm). Tecnica usata quando la massa è piccola (diametro < di 5 mm), incapsulata, non infiltrata e situata sulla superficie o periferia della ghiandola. Lo scolo di latte e di linfa dal tessuto mammario inciso nella ferita può causare infiammazione e irritazione dopo l'intervento (Cassali et al., 2014; Fossum et al., 2019).
- **Mastectomia semplice:** escissione di una ghiandola mammaria intera; tecnica usata quando il tumore coinvolge la porzione centrale della ghiandola o la maggior parte della stessa, generalmente si esegue in caso di tumori fino a 3 cm di diametro. Rimuovere tutta la ghiandola può essere più facile che incidere il tessuto mammario ed evita i problemi postoperatori dovuti allo scolo di latte e di linfa (Cassali et al., 2014; Fossum et al., 2019).

- **Mastectomia regionale:** rimozione della ghiandola coinvolta dalla neoplasia e delle ghiandole adiacenti; tecnica scelta quando esistono più tumori in ghiandole adiacenti della stessa linea o quando la massa è situata tra due ghiandole (Cassali et al., 2014; Fossum et al., 2019).
- **Mastectomia unilaterale:** asportazione di tutte le ghiandole mammarie, i tessuti sottocutanei e i linfatici associati su un solo lato della linea mediana; può essere più veloce e meno traumatica di una serie di nodulectomie o di mastectomie semplici (Cassali et al., 2014; Fossum et al., 2019).
- **Mastectomia bilaterale:** rimozione simultanea di entrambe le linee mammarie; non è una pratica raccomandata in quanto la sutura della cute è difficile se non impossibile in molti casi. Pertanto, al suo posto si preferisce effettuare due mastectomie unilaterali programmate in tempi successivi (Cassali et al., 2014; Fossum et al., 2019).

Se il tumore ha invaso i tessuti sottocutanei, conviene asportare anche la fascia. Alcune lesioni neoplastiche invadono la muscolatura addominale e la loro escissione deve comprendere una porzione della parete addominale (Fossum et al., 2019).

Nel caso non fosse possibile l'escissione completa di tutte le neoformazioni presenti con un solo intervento, un secondo intervento necessita un tempo di attesa generalmente di 3-4 settimane, per consentire la guarigione della cute e il suo rilassamento nei punti di tensione (Fossum et al., 2019).

Le masse infette e ulcerate dovrebbero essere trattate con antibiotici e impacchi caldi per diversi giorni prima dell'intervento chirurgico, per ridurre l'infiammazione e valutare più accuratamente i margini macroscopici del tumore (Fossum et al., 2019).

Le ghiandole mammarie devono essere nuovamente palpate in anestesia generale per garantire che tutti i tumori siano rilevati ed inclusi nella pianificazione chirurgica ed entrambe le linee dovrebbero essere attentamente valutate (Levi et al., 2016). Contrassegnare la posizione di ogni massa, spesso, dopo tricotomia, è possibile identificare altre neoformazioni (Fossum et al., 2019).

Se lo spazio morto è esteso, applicare un drenaggio per aiutare a prevenire l'accumulo di fluidi (Fossum et al., 2019). Applicare un bendaggio imbottito attorno al tronco per comprimere gli spazi morti, fornire un sostegno alla ferita ed assorbire i fluidi. Il bendaggio sarà cambiato con la frequenza necessaria a mantenerlo asciutto. Di solito i bendaggi e le suture si rimuovono rispettivamente dopo 5-7 gg e dopo 7-10 gg dall'intervento chirurgico

(Fossum et al, 2019). In base all'estensione chirurgica è importante valutare l'aspetto analgesico o terapie di sostegno, secondo la necessità (Fossum et al., 2019).

Le attuali raccomandazioni basate sui dati disponibili suggeriscono che, per i cani con un singolo tumore mammario di istotipo noto o sconosciuto, un'escissione chirurgica sufficiente ampia che rimuova completamente il tumore sia da considerarsi adeguata (Sorenmo et al., 2020). Tuttavia, lo sviluppo di tumori secondari è ben documentato ed è stato riportato in oltre il 70% dei cani con tumori mammari maligni dopo la nodulectomia (Sorenmo et al., 2020). Mentre nello studio effettuato da Stratmann il 58% delle cagne intere sottoposte a mastectomia regionale ha sviluppato una nuova massa nel rimanente tessuto mammario ipsilaterale (Stratmann et al., 2008). In questi casi un approccio chirurgico più radicale (mastectomia unilaterale) avrebbe risparmiato una seconda chirurgia (Stratmann et al., 2008). Lo sviluppo di nuove neoplasie nella linea mammaria controlaterale, invece, si è manifestato in una percentuale molto ridotta di casi (Stratmann et al., 2008).

Le mastectomie monolaterali o bilaterali della linea mammaria possono essere il trattamento di scelta per le femmine giovani e intere con tumori multipli, poiché esiste la possibilità di sviluppare ulteriori tumori (Sorenmo et al., 2020). L'escissione ampia non è stata ben delineata, ma per i tumori più grandi si può generalizzare indicando di mantenere un margine laterale di 2 cm, modificato in base alle dimensioni del paziente e del tumore (Sorenmo et al., 2020).

La valutazione del margine chirurgico è fondamentale per i tumori maligni, un reintervento deve essere considerato se il tumore non è stato completamente escisso (Sorenmo et al., 2020). Margini chirurgici puliti sono importanti non solo in cani che non hanno ancora sviluppato metastasi (stadio 2-3), ma anche nei cani con evidenze istologiche di invasione linfonodale (Tran et al., 2016). Una chirurgia locale aggressiva con ottenimento di margini puliti migliora il tempo di sopravvivenza anche in quei cani con invasione dei vasi linfatici rilevata istologicamente (Tran et al., 2016).

Casi in cui siano già presenti metastasi si può prendere in considerazione la rimozione del tumore primario se questo è di entità tale da causare dolore, sanguinamento, ulcerazioni o rischio di ulcerazioni (Cassali et al., 2014).

Se oggi non ci sono dubbi sulla necessità di sottoporre il paziente a linfadenectomia regionale in caso di adenopatia positiva o clinicamente sospetta (Lurie et al., 2006;

Cassali et al., 2014; Marconato e Foglia, 2020), il dilemma rimane nei casi con citologia nodale negativa.

La linfadenectomia profilattica, in questi casi, migliora o peggiora la prognosi? L'opinione scientifica si divide. A favore della linfadenectomia profilattica esiste la convinzione che cellule neoplastiche isolate, eventualmente presenti nel linfonodo, possano nel tempo favorire la progressione neoplastica (Marconato e Foglia, 2020). Pertanto, la linfadenectomia profilattica eliminerebbe un reservoir di cellule maligne. Al contrario, la rimozione di linfonodi che appaiono inalterati può essere inutile e potenzialmente dannosa (Marconato e Foglia, 2020). La linfadenectomia, infatti, si accompagna ad una maggiore morbidità, ad una più lunga durata dell'intervento e a costi più elevati. Inoltre, la rimozione di un organo di difesa immunologica può alterare la risposta dell'ospite al tumore, compromettendo le complesse relazioni immunologiche ospite-tumore (Marconato e Foglia, 2020). Ad oggi l'approccio ai linfonodi sentinella clinicamente e patologicamente non coinvolti rimane un argomento irrisolto.

L'ovarioisterectomia può essere eseguita contemporaneamente all'asportazione del tumore, ma prima della mastectomia, per evitare di disseminare le cellule neoplastiche nella cavità addominale (Fossum et al, 2019). La rimozione del tumore, quindi, dovrebbe essere eseguita dopo la chiusura addominale (Sorenmo et al., 2020).

Le complicanze comprendono dolore, infiammazione, emorragia, formazione di sieroma, infezione, necrosi ischemica, autotraumatismo, deiscenza, edema degli arti posteriori e recidiva anatomica (Fossum et al, 2019). Particolarmente significativa è l'incidenza di complicanze postoperatorie (77%) nei cani sottoposti a mastectomie radicali (Sorenmo et al., 2020).

I pazienti affetti da tumori maligni dovrebbero essere ricontrollati ogni 3-4 mesi, per escludere la presenza di recidive locali o metastasi (Fossum et al., 2019).

Una terapia adiuvante successivamente alla terapia chirurgica della neoplasia primaria può essere proposta con lo scopo di diminuire il rischio di sviluppare future recidive o metastasi (Cassali et al., 2014; Valdivia et al., 2021).

Le terapie adiuvanti includono principalmente chemioterapia, radioterapia o terapie verso target specifici (Valdivia et al., 2021).

Quanto detto fino ad ora non è applicabile ai casi in cui sia presente un carcinoma infiammatorio. A causa dell'estensione microscopica diffusa e profonda di questa forma neoplastica, della considerevole frequenza di metastasi e della coagulopatia tissutale

locale che può essere presente, la chirurgia non è la terapia d'elezione per i carcinomi infiammatori (Sorenmo et al., 2020). Le cagne che non vengono sottoposte ad eutanasia al momento della diagnosi tipicamente sono sottoposte a trattamento medico palliativo attraverso la somministrazione di antimicrobici, glucocorticoidi e FANS ma la prognosi di questi tumori rimane sfavorevole (Marconato et al., 2009).

Un'alternativa sembra essere la radioterapia, la quale si è dimostrata efficace nell'allungare il tempo di progressione neoplastica (Rossi et al., 2018).

5.2. Chemioterapia

Sebbene la chemioterapia sia spesso utilizzata come terapia adiuvante nelle cagne con tumori mammari maligni, le informazioni riguardo la sua efficacia sono limitate (Cassali et al., 2014). Per questo motivo non sono presenti protocolli standard raccomandati per il suo utilizzo. Nonostante questa incertezza, la chemioterapia è raccomandata nei cani con tumori "ad alto rischio" (Sorenmo et al., 2020). Questa pratica si basa sulla considerazione che i cani con tumori di grandi dimensioni, linfonodi positivi e istologia aggressiva non possano essere trattati efficacemente soltanto con la chirurgia (Sorenmo et al., 2020).

In protocolli attualmente proposti in letteratura sono costituiti da un'associazione di doxorubicina e ciclofosfamide oppure l'utilizzo di cisplatino o carboplatino come esposto nelle seguenti tabelle (Cassali et al., 2014).

Protocollo chemioterapico con Doxorubicina e Ciclofosfamide:

Giorno	Doxorubicina	Ciclofosfamide
1°	X	
3°/4°/5°/6°		X
22°	Ripetere il ciclo ogni 21 giorni, dalle 3 alle 6 volte	
Posologia: Doxorubicina 30 mg/m2 IV o 1 mg/kg IV (in cani con meno di 10 kg) Ciclofosfamide 50 mg/m2 OS		

Protocollo chemioterapico con Carboplatino:

Giorno	Carboplatino
1°	X
22°	Ripetere il ciclo ogni 21 giorni, dalle 3 alle 6 volte
Posologia: Carboplatino 250-300 mg/m ² IV ogni 21 gg	

Protocollo chemioterapico con Doxorubicina e Carboplatino (consigliato in caso di carcinosarcoma):

Giorno	Doxorubicina	Carboplatino
1°	X	
15°		X
22°	Somministrare i farmaci in modo alternato ogni 2-3 settimane per un totale di 3 somministrazioni ciascuno	
Posologia: Doxorubicina 30 mg/m2 IV o 1 mg/kg IV (in cani con meno di 10 kg) Carboplatino 250-300 mg/m2 IV ogni 21 giorni		

In presenza di metastasi a livello polmonare o altri organi, l'utilizzo di Paclitaxel in alcuni casi ha portato ad un allungamento del tempo di sopravvivenza (Cassali et al., 2014).

Protocollo chemioterapico con Paclitaxel:

Giorno	Paclitaxel
1°	X
22°	Somministrare ogni 21 giorni, dalle 3 alle 6 volte
Posologia: Paclitaxel 170 mg/m ² IV o 5 mg/kg IV Premedicazione con Desametasone e Difenidramina tre giorni prima e dopo la chemioterapia per minimizzare le reazioni da ipersensibilità.	

Il monitoraggio dei pazienti sottoposti a chemioterapia è consigliato con una cadenza trimestrale per il primo anno, allungando successivamente l'intervallo a 6 mesi (Cassali et al., 2014).

Gli agenti chemioterapici non vanno a colpire selettivamente le cellule tumorali, ma anche quelle normali con elevato indice mitotico (Cassali et al., 2014). Tra i disordini più comuni provocati da questa terapia troviamo mielosoppressione, disordini gastroenterici ed alopecia (Cassali et al., 2014).

A partire dal 2007 in medicina veterinaria è stata studiata la chemioterapia metronomica in diverse tipologie tumorali; questa terapia prevede la somministrazione della dose più bassa biologicamente efficace ad intervalli regolari frequenti (Valdivia et al., 2021). Solamente uno studio si è concentrato unicamente sui tumori mammari canini (De Campos et al., 2018). Questo studio ha riportato una sopravvivenza più lunga nei casi in cui i pazienti sono stati trattati con chirurgia e terapia metronomica rispetto a quelli trattati con chirurgia e chemioterapia convenzionale (De Campos et al., 2018).

5.3. Radioterapia

La radioterapia viene comunemente usata nel trattamento locoregionale del tumore al seno nella donna, pochi studi però sono presenti in medicina veterinaria per quanto riguarda questa patologia nella cagna (Valdivia et al., 2021). In particolare, uno studio è stato eseguito in cagne con carcinoma mammario infiammatorio utilizzando un protocollo radioterapico combinato alla somministrazione di piroxicam, toceranib e thalidomide. Ne è risultato un allungamento del tempo di progressione neoplastica nei soggetti sottoposti a radioterapia rispetto alle cagne trattate con lo stesso protocollo ma senza radioterapia (Rossi et al., 2018).

5.4. Terapie verso target specifici

Negli ultimi due decenni si è visto un notevole avanzamento in ambito terapeutico per quanto riguarda il tumore al seno nella donna, con lo sviluppo di terapie mirate a specifici bersagli molecolari (Valdivia et al., 2021). Le terapie verso target specifici utilizzano farmaci che bloccano la crescita tumorale interferendo con specifiche molecole individualmente espresse, responsabili della proliferazione, sopravvivenza, metastasi o microambiente cellulare tumorale (Valdivia et al., 2021). Ad oggi le terapie di precisione non vengono ancora attuate routinariamente nei cani con neoplasie mammarie.

5.4.1. Terapia ormonale

L'uso della terapia ormonale nei tumori mammari della cagna si basa sulla dipendenza di alcuni tumori dagli ormoni sessuali e quindi sulla possibilità di ridurre le recidive e prolungare la sopravvivenza nei soggetti affetti da tumori HR-positivi (Sorenmo et al., 2020). Gli aspetti riguardanti l'ovariectomia / ovarioisterectomia sono già stati precedentemente discussi, di seguito verranno esposti gli aspetti relativi alla terapia medica.

Uno dei possibili approcci della terapia ormonale si basa sull'utilizzo di sostanze in grado di agire sui recettori degli estrogeni nei tumori ER-positivi (Sorenmo et al., 2020). Il Tamoxifene, un antagonista ER, viene comunemente utilizzato nel trattamento dei tumori al seno della donna; a causa dei suoi effetti pro-estrogenici, però, il suo utilizzo ha una minor attuabilità nella cagna (Tavares et al., 2010). Tra gli effetti avversi si possono avere edema vulvare, piometra, polipi endometriali e retiniti (Tavares et al., 2010).

Gli estrogeni non sono prodotti solamente dalle ovaie ma anche da grasso, fegato, muscolo e tessuto mammario attraverso l'aromatasi (Tremont et al., 2017). Partendo da questo presupposto, nella donna gli inibitori dell'aromatasi sono utilizzati nelle pazienti in menopausa con tumori al seno ER positivi (Tremont et al., 2017). In medicina veterinaria non sono ancora presenti trials clinici sull'uso di questi inibitori in cagne con tumori mammari, ad eccezione di uno studio condotto in vitro riguardante il carcinoma mammario infiammatorio canino (De Andrés et al., 2016). L'espressione dell'aromatasi raggiunge livelli più elevati nel carcinoma infiammatorio; l'utilizzo di letrozole, un inibitore delle aromatasi, si è dimostrato in grado di ridurre la proliferazione cellulare in questi tumori (De Andrés et al., 2016). Questi risultati preliminari ottenuti in vitro possono essere la base per futuri trials clinici.

L'Aglepristone agisce come antagonista dei recettori del progesterone, l'altro protagonista nella tumorigenesi mammaria canina (Sorenmo et al., 2020). Questo principio attivo si è dimostrato valido nel diminuire l'espressione dei PR e ridurre l'indice proliferativo nei carcinomi mammari canini (Guil-Luna et al., 2017). Permette, inoltre, di aumentare l'intervallo libero da malattia in seguito a chirurgia in animali con carcinomi PR positivi, di dimensioni inferiori ai 3 cm e di grado istologico I e II (Guil-Luna et al., 2017). L'applicazione della terapia antiprogestinica ai tumori mammari PR positivi necessita però di ulteriori studi su più ampia scala e con tempi di follow-up più lunghi.

L'ossitocina tra le sue funzioni è coinvolta anche nel processo di eiezione del latte ed è stata correlata al processo di cancerogenesi mammaria (Valdivia et al., 2021). L'espressione dei recettori per l'ossitocina nei tumori mammari canini tende ad essere più elevata nei tumori benigni rispetto a quelli maligni (Benavente et al., 2019). Tra i maligni sono maggiormente espressi in quelli di grado I e II rispetto a quelli di grado III e sono, inoltre, correlati ai tumori ER positivi, nei quali sono espressi in quantità maggiore (Benavente et al., 2019). Questi ritrovamenti suggeriscono che l'ossitocina può avere un ruolo nella tumorigenesi mammaria canina ed il rilevamento dell'espressione dei suoi recettori può essere sfruttato in futuro in ambito terapeutico (Benavente et al., 2019).

Si ipotizza che la Desmopressina abbia proprietà antimetastatiche dovute ad un miglioramento dell'emostasi ed alla sua capacità di impedire alle cellule tumorali di accedere al sistema vascolare durante la manipolazione chirurgica (Sorenmo et al., 2020). Uno studio prospettico randomizzato ha dimostrato un miglioramento della sopravvivenza nei cani con carcinoma di grado I e II trattati perioperatoriamente con Desmopressina (Hermo et al., 2011). Tuttavia, i dati esposti da Hermo si basano su un numero ridotto di soggetti e questi ritrovamenti non sono stati confermati dal trial prospettico randomizzato condotto da Sorenmo et al. il quale non concorda sull'effetto della Desmopressina nel prevenire le metastasi in cagne con carcinomi mammari (Sorenmo, Durham et al., 2020).

5.4.2. Recettori tirosin kinasici

I recettori tirosin kinasici catalizzano una serie di fosforilazioni di proteine target coinvolte nella proliferazione cellulare, metabolismo, motilità, sopravvivenza ed apoptosi, attivazione delle cellule endoteliali e neovascolarizzazione (Valdivia et al., 2021). I recettori tirosin kinasici coinvolti nei processi neoplastici sono HER-2, recettore per il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFR), recettore per il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGFR), recettore del fattore delle cellule staminali (c-KitR) e il fattore stimolante le colonie macrofagiche (CSF-1) (Ranieri et al., 2013). Le molecole che vanno ad agire su questi target sono gli inibitori della tirosin kinasi (TKi) e anticorpi monoclonali (mAb); i primi agiscono sia a livello intracellulare che extracellulare mentre gli mAb solo a livello extracellulare (Valdivia et al., 2021). Molti TKi sono assunti per via orale facilitandone la somministrazione; tuttavia, i pochi dati disponibili di queste terapie applicate alla specie canina ed i costi elevati, rendono il loro utilizzo limitato (Ranieri et al., 2013).

In medicina umana sono già presenti diversi composti approvati per la terapia verso i recettori tirosin kinasici (Ranieri et al., 2013). Per quanto riguarda la loro applicazione in

medicina veterinaria ad ora sono presenti prevalentemente studi in vitro, i quali presentano risultati promettenti sulla loro futura applicazione nella terapia dei tumori mammari canini (Valdivia et al., 2021).

La sovraespressione di c-KitR o mutazioni a suo carico sono state rilevate in diverse tipologie tumorali tra cui i tumori mammari maligni nei quali risulta sovraespresso (Kubo et al., 1998), inoltre, è correlato all'indice proliferativo e all'angiogenesi (Valdivia et al., 2021). In medicina veterinaria ci sono due TKi approvati contro c-KitR: toceranib e mastinib (Valdivia et al., 2021). Toceranib è un farmaco registrato per il trattamento dei tumori dei mastociti e si è dimostrato efficace in vitro nel ridurre la proliferazione cellulare in linee cellulari di carcinoma mammario canino (Gattino et al., 2018). Tuttavia, la sua valutazione nei trial clinici relativi ai tumori mammari è limitata ed associata ad altre terapie adiuvanti (Rossi et al., 2018). Anche mastinib viene raccomandato per il trattamento dei tumori dei mastociti (Hahn et al., 2008) ma non sono presenti studi riguardanti i tumori mammari canini. Sebbene i TKi (in particolare toceranib) vengano usati nel trattamento dei tumori mammari, le evidenze sulla loro efficacia sono puramente aneddotiche in quanto, come specificato precedentemente, sono pochi o assenti gli studi eseguiti relativi a questa tipologia neoplastica (Valdivia et al., 2021).

5.4.3. p53

Mutazioni del gene p53 possono portare ad un'alterazione della sua funzione oncosoppressiva e conseguente instabilità genomica (Ochiai et al., 2018). Queste mutazioni sono state descritte in diverse tipologie tumorali nei cani (Setoguchi et al., 2001), compresi i tumori mammari (Ochiai et al., 2018). Nella donna circa il 30% dei tumori al seno possiedono mutazioni che coinvolgono p53, ma questa frequenza varia in base al sottotipo molecolare, arrivando anche all'88% nel caso dei tumori tripli negativi (Valdivia et al., 2021). Nella cagna i tumori mammari maligni sono caratterizzati da più alti livelli di espressione di p53 rispetto a quelli benigni (Rodo e Malicka, 2008). La sovraespressione di p53 e sue mutazioni sono state correlate ad una prognosi più sfavorevole (Lee et al., 2004). Visto il coinvolgimento delle mutazioni di p53 nel processo di cancerogenesi, in umana sono stati eseguiti diversi studi per capire in che modo andare ad agire su questo aspetto (Valdivia et al., 2021), promuovendo la degradazione di proteine p53 mutate, ripristinandone l'attività o stimolando l'attività immunitaria contro queste alterazioni (Valdivia et al., 2021). Al contrario, è presente un solo studio in vitro relativo alla terapia verso p53 nei tumori mammari canini. Le cellule neoplastiche sovraesprimendo

l'esportina-1 impediscono il legame di p53 con il DNA impedendone l'attività di riparazione o pro-apoptotica; due composti, KPT-183 e KPT-355 sembrano essere efficaci (in vitro) nell'inibire l'azione dell'esportina-1 su cellule di carcinoma mammario canino (Grayton et al., 2017).

5.4.4. Ciclossigenasi

Le ciclossigenasi (COX) sono un gruppo di enzimi che catalizzano la conversione dell'acido arachidonico in prostaglandine, prostaciline e trombossani (Klopfleisch et al., 2011). Le COX esistono in tre isoforme, COX-1 (costitutive) presenti in diversi tessuti, COX-2 (inducibili) presente in cellule normali e neoplastiche, indotte da diversi stimoli (ipossia, fattori di crescita, infiammazione, oncogeni) (Klopfleisch et al., 2011) e COX-3 espresse principalmente nel SNC e nella parete aortica (Szweda et al., 2019). Mentre l'espressione di COX-1 non sempre essere correlata ad alcun aspetto relativo ai tumori mammari, al contrario, una sovraespressione di COX-2 è stata associata a tumori mammari maligni e maggiore aggressività neoplastica (Klopfleisch et al., 2011). L'espressione delle COX-2 si può riscontrare anche nelle neoplasie mammarie benigne, seppur in minore quantità (Dorè et al., 2003). Un'aumentata espressione di COX-2 sembra promuovere l'oncogenesi attraverso l'inibizione dell'apoptosi, l'aumento della neo-angiogenesi, la promozione del processo metastatico e l'indebolimento del sistema immunitario (Szweda et al., 2019). FANS non selettivi come meloxicam o piroxicam sono stati testati in vitro in cellule di carcinoma mammario canino portando ad induzione dell'apoptosi, inibizione della migrazione e arresto del ciclo cellulare (Valdivia et al., 2021). In aggiunta, un piccolo gruppo di cagne con carcinoma mammario infiammatorio è stato trattato con piroxicam; le cagne sottoposte a questo trattamento hanno mostrato un tempo di sopravvivenza medio significativamente più lungo rispetto alle cagne trattate con doxorubicina (De M Souza et al., 2009). Grazie alla disponibilità di farmaci selettivi verso le COX-2 sono stati condotti ulteriori studi in vitro dimostrando la capacità di celecoxib e mavacoxib nell'inibire la proliferazione cellulare, indurre l'apoptosi e ridurre la migrazione di cellule di carcinoma mammario canino (Tamura et al., 2015; Hurst et al., 2019). L'azione di questi inibitori selettivi delle COX-2 è stata riscontrata anche in linee cellulari con una bassa espressione di COX-2, suggerendo la loro possibile applicazione terapeutica indipendentemente dall'espressione delle ciclossigenasi (Tamura et al., 2015; Hurst et al., 2019). Deracoxib è stato testato, sempre in vitro, in associazione alla doxorubicina, portando ad un effetto sinergico nell'arrestare il ciclo cellulare ed indurre l'apoptosi, inoltre,

ha permesso di ridurre la dose di doxorubicina (Bakirel et al., 2016). In uno studio prospettico caso-controllo, l'utilizzo di firecoxib come terapia adiuvante la chirurgia ha portato ad un allungamento del periodo libero da malattia e di sopravvivenza in cagne con carcinomi mammari di alto grado esprimenti COX-2 rispetto al trattamento chemioterapico (mitoxantrone) (Arenas et al., 2016).

5.4.5. Transizione epitelio-mesenchimale e cellule staminali tumorali

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è un processo mediante il quale le cellule epiteliali perdono le loro caratteristiche epiteliali e la polarità ed acquisiscono un fenotipo mesenchimale con aumento del comportamento migratorio e capacità metastatiche (Sorensen et al., 2011). Nel processo di EMT un ruolo importante è dato dall'alterata espressione delle molecole di adesione, principalmente le caderine (Klopfleisch et al., 2011). Le caderine sono molecole responsabili dell'adesione tra cellule e del mantenimento della normale struttura e polarizzazione dei tessuti. Le E-caderine sono quelle espresse dalle cellule dell'epitelio luminale mentre le P-caderine si trovano nelle cellule mioepiteliali (Klopfleisch et al., 2011). Carcinomi mammari canini poco differenziati e metastatici sono caratterizzati da una *down-regulation* o da una mancata espressione delle E-caderine, suggerendo il loro ruolo nel processo di progressione verso forme più maligne ed aggressive (Klopfleisch et al., 2011). La loro sottoespressione è stata inoltre correlata ad un inferiore intervallo libero da malattia e minor sopravvivenza (Klopfleisch et al., 2011). Un'aberrante espressione di P-caderine, invece, è correlata significativamente all'aggressività biologica nei tumori mammari canini ed al loro potenziale infiltrativo (Klopfleisch et al., 2011). L'interazione tra caderine e catenine è fondamentale per l'adesione tra cellule e una sottoespressione di catenine porta anch'essa ad una progressione verso forme maggiormente invasive (Klopfleisch et al., 2011).

Le cellule staminali tumorali si possono differenziare generando diversi *subsets* cellulari riscontrabili nel tumore primario (Valdivia et al., 2021). Il percorso molecolare che porta all'EMT è marcatamente sovrapposto a quello che porta alla formazione delle cellule staminali tumorali, permettendo alle cellule epiteliali che vanno incontro al processo di EMT di poter generare a loro volta cellule staminali neoplastiche (Valdivia et al., 2021). Nei tumori al seno della donna, queste cellule staminali sono state associate a metastasi ricorrenti, refrattarie a chemioterapici e a terapie verso target specifici (Gooding e Schiemann, 2020; Valdivia et al., 2021).

Con lo scopo di agire a questo livello della cancerogenesi e diffusione metastatica, in medicina veterinaria sono stati valutati in vitro ZEB1 e ZEB2 come potenziali target terapeutici (Xavier et al., 2018). ZEB1 e ZEB2 sono fattori di trascrizione in grado di influenzare l'espressione delle molecole di adesione cellulare e quindi influenzare l'EMT; tuttavia, ad oggi non sono presenti molecole in grado di agire verso questi target (Valdivia et al. 2021).

Sono diversi i composti commercializzati per determinate patologie che vengono testati anche per le loro capacità terapeutiche verso i tumori mammari. Nello specifico, tra i composti indagati in vitro per la loro possibile applicazione nell'inibire la transizione epitelio-mesenchimale e le cellule staminali tumorali ci sono melatonina, metformina, simvastatina ed artemisinina (Valdivia et al., 2021).

5.5. Immunoterapia

La risposta del sistema immunitario alla presenza di cellule neoplastiche si compone di tre steps. In prima battuta il sistema immunitario dell'ospite risponde cercando di eliminare le cellule tumorali prima che possano dare manifestazioni cliniche. Se permangono cloni tumorali, questi sono inattivi in una fase di equilibrio. Nella fase di evasione le cellule neoplastiche cercano di fuggire al sistema immunitario portando eventualmente a manifestazioni cliniche (Valdivia et al., 2021). Diversi meccanismi attuati dalle cellule tumorali per evadere dalla risposta immunitarie sono noti, alcuni esempi sono la sottoespressione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), l'attivazione di molecole inibitorie come CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) o l'*up-regulation* di PD-L1 (*programmed death ligand 1*) che si lega al recettore presente sui linfociti T sopprimendone la funzione (Valdivia et al., 2021). Tuttavia, buona parte dei meccanismi di interazione tra le cellule tumorali e il sistema immunitario sono ancora sconosciuti.

L'immunoterapia è una terapia emergente in sia in ambito umano che in medicina veterinaria. L'utilizzo di anticorpi monoclonali per modulare la risposta immunitaria del paziente è già stato approvato nei confronti di tumori al seno tripli negativi PD-L1 +, tuttavia, in medicina veterinaria, principalmente per gli elevati costi richiesti, non sono ancora presenti trial clinici atti a valutare la terapia con mAb anti-PD1/PD-L1 (Valdivia et al., 2021).

Una forma di applicazione dell'immunoterapia cellulare utilizza cellule generate dalla fusione di cellule presentanti l'antigene con cellule tumorali con lo scopo di esporre al

sistema immunitario tutti gli antigeni associati al processo neoplastico ed attivare la risposta immunitaria (Valdivia et al., 2021).

I vaccini a DNA, invece, si basano sull'introduzione di uno o più geni (es antigeni tumorali, citochine, ...) in plasmidi che una volta somministrati al paziente verranno espressi (Valdivia et al., 2021).

Infine, i virus oncolitici esprimono una citotossicità selettiva nei confronti delle cellule tumorali e possono favorire il ripristino della funzione immunitaria antitumorale (Valdivia et al., 2021).

Tra queste diverse applicazioni dell'immunoterapia solamente pochi studi sono arrivati ad essere eseguiti in un contesto clinico. Un vaccino a DNA basato sulla proteina p62 (coinvolta nella macroautofagia, essenziale per lo sviluppo e sopravvivenza dei tumori) è stato inculato intramuscolo in cagne con carcinomi mammari ottenendo una stabilizzazione della crescita tumorale mediante infiltrazione linfocitica ed incapsulamento della neoplasia tramite reazione fibrotica (Gabai et al., 2014; Venanzi et al., 2019).

Gli studi presi in esame da Valdivia (2021) riflettono l'attuale stato della ricerca sui tumori mammari canini in ambito immunoterapeutico e dimostrano l'utilità della ricerca sui carcinomi mammari canini come modello naturale per lo studio del cancro al seno nella donna. Una criticità che accomuna questi studi è il ridotto numero di pazienti reclutati, tale per cui risulta difficile estrapolare risultati conclusivi. Rappresentano comunque una base per la messa a punto di studi su più larga scala e per una futura diffusione di alcuni di questi approcci terapeutici.

5.6. Altre terapie

Altre terapie del futuro comprendono l'utilizzo di nanotecnologie. Con questo termine ci si riferisce a nanoparticelle di dimensioni inferiori ai 100 nm che possono legare e trasportare agenti terapeutici (Valdivia et al., 2021). La loro applicazione in ambito terapeutico oncologico potrebbe permettere un accumulo farmacologico maggiore in tessuti target, aumentandone l'effetto terapeutico (Valdivia et al., 2021). Per la terapia del cancro al seno nella donna è già stato approvato l'utilizzo di doxorubicina (Doxil®) e paclitaxel (Abraxane®) su nanoparticelle (Valdivia et al., 2021).

Il crescente interesse per la medicina naturale ha portato alla valutazione delle proprietà anticancerogene di diversi composti (Valdivia et al., 2021). Tra i fitofarmaci studiati in relazione ai tumori al seno una particolare menzione riguarda la curcumina, composto isolato dal rizoma della curcuma (*Curcuma longa*) (Devassy et al., 2015). Il principale

problema di questo composto risiede nel fatto che meno dell'1% della quantità somministrata oralmente viene assorbita (Withers et al., 2018). Per ovviare a questo problema, è stata ideata una formulazione di curcumina incapsulata in liposomi (Lipocurc™) che ne consente la somministrazione endovenosa (Withers et al., 2018). Il suo effetto è stato testato sia in vitro sia su un numero limitato di cani con tumori di diverso genere, compresi tumori mammari, offrendo risultati promettenti in vitro nel controllo della proliferazione cellulare neoplastica e della neoangiogenesi, tuttavia, non si sono ottenuti risultati conclusivi dai cani trattati (Withers et al., 2018).

6. Fattori prognostici

Per fattori prognostici si intendono una o più caratteristiche specifiche cliniche, patologiche o biologiche che permettono di predire l'*outcome* clinico e la sopravvivenza dei pazienti senza che questi siano sottoposti ad ulteriori terapie o a terapie adiuvanti successive alla prima chirurgia (Cassali et al., 2014). L'analisi di queste caratteristiche permette, inoltre, la selezione dei pazienti da sottoporre a trattamenti individualizzati e specifici (Cassali et al., 2014).

6.1. Fattori prognostici clinici

Le dimensioni della neoplasia sono considerate uno degli aspetti macroscopici di maggior rilevanza per quanto riguarda il comportamento neoplastico (Sorenmo et al., 2009). I tumori benigni sono generalmente di dimensioni inferiori rispetto a quelli maligni (Sorenmo et al., 2009; Burrai et al., 2020; Banchi et al., 2021). Nel sistema di stadiazione TNM la classificazione dei tumori in base alle dimensioni viene suddivisa in tre categorie: T1 < 3 cm, T2 3-5 cm, T3 > 5 cm. Cani con tumori mammari di dimensioni inferiori ai 3 cm di diametro hanno una prognosi significativamente più favorevole rispetto a cani con tumori più grandi (Tran et al., 2016); mentre non sono state rilevate differenze nella prognosi di cani con dimensioni tumorali superiori (T2 e T3) (Sorenmo et al., 2011). Tuttavia, la presenza di un alto numero di tumori maligni di dimensioni inferiori ad 1 cm porta alla necessità della riconsiderazione di questo parametro, anche nella valutazione TNM (Burrai et al., 2020).

Sia il sistema di stadiazione originale della WHO che quello rivisitato forniscono informazioni prognostiche, tuttavia, il sistema rivisitato sembra riflettere meglio l'effetto dello stato linfonodale sulla prognosi (Sorenmo et al., 2011). Lo stato linfonodale, in base alla stadiazione TNM modificata viene classificato come non metastatico o metastatico (stadio IV) in seguito ai risultati delle indagini citologiche o istopatologiche (Sorenmo et al., 2011). Il ritrovamento di metastasi a livello linfonodale implica la possibile futura diffusione di metastasi a distanza portando ad una prognosi sfavorevole (Szczubial e Lopuszynski, 2011). Diversi studi condotti su cagne con carcinomi mammari hanno dimostrato che lo stato dei linfonodi regionali è altamente prognostico (Chang et al., 2005; Szczubial e Lopuszynski, 2011; De Araujo et al., 2015).

Tuttavia, solo gli studi più recenti si sono basati sulla determinazione del coinvolgimento linfonodale mediante analisi immunoistochimica, al fine di rilevare anche la presenza di

micrometastasi (Szczybual e Lopuszynski, 2011; De Araujo et al., 2015). La presenza di micrometastasi, però, non è stata correlata ad una diminuzione dell'MST (De Araujo et al., 2015; Tran et al., 2016).; al contrario, cani con cellule tumorali metastatiche isolate hanno mostrato un esito più sfavorevole (De Araujo et al., 2015).

In base a quanto esposto precedentemente in questo testo (sezione 1.2) non sempre i linfonodi regionali corrispondono ai linfonodi sentinella. È interessante notare, però, che gli studi sul valore prognostico delle metastasi linfonodali si riferiscono ai linfonodi regionali, non rappresentando quella fetta di popolazione in cui il drenaggio linfatico bypassa i linfonodi regionali.

Un'altra criticità è data dal tipo tumorale; i carcinomi sono i tumori mammari canini più frequenti (Chang et al., 2005), tuttavia, alcuni soggetti possono sviluppare sarcomi mammari primari i quali tipicamente metastatizzano per via ematogena bypassando le stazioni di controllo linfonodali (Sorensen et al., 2011). In questi casi la prognosi infausta è indipendente dalla positività linfonodale alle metastasi (Sorensen et al., 2011).

Cagne con carcinomi mammari che presentano metastasi al momento della diagnosi hanno una prognosi più sfavorevole rispetto a cagne senza evidenza di metastasi (Sleeckx et al., 2011).

La stadiazione TNM si basa sulle dimensioni del tumore, lo stato linfonodale e la presenza di metastasi; sebbene sia caratterizzata da alcune criticità come appena esposto, lo stadio del paziente è correlato alla sopravvivenza, con un significativo accorciamento della sopravvivenza nei soggetti in stadio avanzato (tempo mediano di sopravvivenza (MST) di 6 mesi in cani di stadio IV e V) (Sleeckx et al., 2011).

Un altro aspetto rilevabile clinicamente è la presenza di ulcerazioni, sebbene la presenza di ulcerazioni sia stata correlata alla malignità tumorale (Sleeckx et al., 2011) bisogna tenere in considerazione possibili altre cause quali traumi auto-indotti, ischemia cutanea o infezioni, che non necessariamente sono associate ad un comportamento biologico aggressivo (Santos et al., 2013).

Infine, si ricorda l'effetto protettivo dato dall'ovarioisterectomia sia in giovane età che in contemporanea alla mastectomia, specialmente in cagne con tumori benigni o positivi ai recettori ormonali (Kristiansen et al., 2016; Banchi et al., 2021).

6.2. Fattori prognostici istopatologici

Importanti informazioni prognostiche si possono estrapolare dall'istotipo tumorale, dal grado neoplastico e da altri aspetti quali l'invasione vascolare/linfatica o quella stromale circostante (Sorenmo et al., 2020).

Nei cani che presentano tumori mammari multipli la prognosi è determinata dal tumore più aggressivo e le decisioni terapeutiche riguardanti i trattamenti adiuvanti dovrebbero essere basate sul tumore più grande o su quello con l'istologia più aggressiva (Sorenmo et al., 2020). In molti casi il tumore più aggressivo è il più grande (Sorenmo et al., 2009).

Sulla base della classificazione proposta da Goldschmidt (2011), Rasotto et al. hanno cercato di determinare la valenza prognostica dei più comuni istotipi di neoplasie mammarie canine (Rasotto et al., 2017).

Tra gli istotipi più aggressivi troviamo i carcinomi anaplastici e i carcinosarcomi con un tempo mediano di sopravvivenza (MST) di 3 mesi, seguiti dai carcinomi solidi (MST 8 mesi), comedocarcinomi (MST 14 mesi) e carcinomi squamosi (MST 18 mesi) (Rasotto et al., 2017). Un tempo di sopravvivenza superiore è stato osservato per i cani con carcinoma complesso e carcinoma tubulare semplice, mentre un rischio di mortalità oltre 10 volte superiore è stato associato ad altri tipi, come il carcinoma tubulo-papillare semplice, il carcinoma papillare intraduttale ed il carcinoma e mioepitelioma maligno (Rasotto et al., 2017; Sorenmo et al., 2020).

Contemporaneamente ai dati sulla sopravvivenza sono stati esaminati anche i tassi di recidiva e metastasi. I più alti tassi di metastasi sono stati registrati per i carcinosarcomi (100%) e i carcinomi anaplastici (89%) (Rasotto et al., 2017). Le metastasi a distanza sono comuni anche in cani con comedocarcinomi (82%), carcinomi solidi (65%) e carcinomi adenosquamosi (60%) (Rasotto et al., 2017). I carcinomi adenosquamosi sono anche i tumori con più elevato tasso di recidiva (50%), seguiti dai carcinomi anaplastici (44%) e dai carcinosarcomi (37%).

Indipendentemente dal trattamento a cui vengono sottoposte le cagne con carcinoma infiammatorio, la sopravvivenza media non supera i 30-60 giorni dalla diagnosi (Marconato et al., 2009; F. Rossi et al., 2018). L'assenza di coagulopatie è considerata un fattore favorevole e caratterizza i soggetti con più elevati tempi di sopravvivenza (Marconato et al., 2009).

La presenza di istotipi benigni (adenomi complessi, adenomi semplici e tumori misti benigni) non è stata associata a recidive o metastasi e non ha portato alla morte i soggetti valutati in un periodo di follow up di 2 anni (Rasotto et al., 2017).

Anche il grado istologico dei tumori è stato correlato alla sopravvivenza generale con un MST di 6 mesi in soggetti con neoplasie di grado III (Rasotto et al., 2017). Tra i tumori più frequentemente classificati come grado III ci sono i carcinomi adenosquamosi, i comedocarcinomi, i carcinomi solidi ed i carcinomi anaplastici (Rasotto et al., 2017). È interessante notare che i risultati ottenuti relativi ai tumori di grado I e II, invece, non differiscono eccessivamente (Rasotto et al., 2017). Il tasso di sopravvivenza ad 1 anno di distanza è stato rispettivamente di 81% (grado I) e 96% (grado II), mentre la sopravvivenza a 2 anni del 69% (grado I) e 78% (grado II) (Rasotto et al., 2017).

L'invasione linfatica, intesa come l'infiltrazione dei vasi linfatici peritumorali e/o dei linfonodi regionali, porta ad un MST di 5 mesi ed una sopravvivenza a 2 anni dello 0% (Rasotto et al., 2017), predisponendo allo sviluppo di metastasi a distanza e recidive locali. Infine, la presenza di infiltrazione neoplastica nei margini chirurgici di escissione si è dimostrata significativa per quanto riguarda le recidive locali (Rasotto et al., 2017). Una chirurgia locale aggressiva con ottenimento di margini indenni migliora il tempo di sopravvivenza (Tran et al., 2016).

6.3. Fattori prognostici molecolari

I tumori benigni hanno maggiori probabilità, rispetto ai tumori maligni, di esprimere sia recettori degli estrogeni, sia quelli del progesterone (Mainenti et al., 2014). I tumori più grandi e i tumori indifferenziati o anaplastici hanno meno probabilità di esprimere i recettori rispetto ai tumori con istologia più differenziata (Mainenti et al., 2014; Peña et al., 2014). L'espressione tumorale di ER e PR è quindi associata ad un risultato più favorevole (Sorenmo et al., 2020).

Un'elevata espressione del marker di proliferazione cellulare Ki-67 è correlata ad un maggior rischio di metastasi e morte legata alla patologia neoplastica con una diminuzione sia dell'intervallo libero da malattia sia della sopravvivenza (Sleecks et al., 2011; Klopfleisch et al., 2011).

Le COX-2 sono coinvolte in diversi step del processo di cancerogenesi, tra cui la proliferazione tumorale, l'inibizione dell'apoptosi, l'invasività, il potere metastatico e l'angiogenesi (Goldschmidt et al., 2017). Le COX-2 sono maggiormente espresse in tumori

maligni, con prognosi più sfavorevole, sono quindi inversamente correlata al tasso di sopravvivenza (Cassali et al., 2014; Goldschmidt et al., 2017).

Anche la sovraespressione di p53 e sue mutazioni sono state correlate ad una prognosi più sfavorevole (Lee et al., 2004).

Il valore prognostico di HER-2 per quanto riguarda i tumori mammari canini rimane tuttora sconosciuto (Pena et al., 2014; Valdivia et al., 2021). Futuri studi conformi alle linee guida preanalitiche, analitiche e postanalitiche proposte da Pena et al. (2014) potrebbero chiarirne il ruolo.

6.4. Fattori prognostici relativi alla chirurgia

Un approccio chirurgico aggressivo come la mastectomia unilaterale non sembra influenzare lo sviluppo di nuovi tumori mammari nella linea controlaterale e nemmeno migliorare il tempo di sopravvivenza (Sorenmo et al., 2020). Un approccio chirurgico più conservativo, invece, ha portato circa il 60% delle cagne a sviluppare nuovi tumori mammari nelle ghiandole mammarie ipsilaterali alla mastectomia regionale (Strattman et al., 2008). L'escissione dell'intera linea mammaria, quindi, previene una nuova chirurgia in seguito alla comparsa di nuovi tumori ipsilaterali (Strattman et al., 2008).

7. La comunicazione con il proprietario

I termini “tumore” e “chemioterapia” incutono timore e possono far riemergere esperienze già vissute nei confronti di membri della famiglia o di amici, portando il proprietario a rifiutare inizialmente qualsiasi trattamento per paura che l'animale possa soffrire. I proprietari degli animali devono percepire un clima generale di fiducia e supporto in tutta la struttura veterinaria. Se ricevono informazioni discordanti, troveranno più difficile prendere una decisione; potrebbero persino scegliere di portare il loro animale in un'altra struttura dove ritengono che il personale lavori in un team più coeso (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019).

Dopo aver comunicato la diagnosi al proprietario e avergli dato l'opportunità di discutere di eventuali problemi, bisognerà lasciargli il tempo necessario affinché assimili l'informazione e prenda una decisione, fornendo supporto e solidarietà. Questo è uno degli aspetti più delicati e cruciali del rapporto con il cliente, è importante che il proprietario comprenda che lui e il veterinario hanno lo stesso obiettivo che è, oltre alla cura dell'animale, assicurare un'adeguata qualità della vita, “il nostro obiettivo è assicurare che Lulù viva bene il più a lungo possibile” (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019).

Nel caso in cui il proprietario affrontasse la notizia con uno stato emotivo di negazione, è importante che il veterinario comunichi le informazioni necessarie in maniera graduale, accertandosi che il proprietario presti ascolto e comprenda i termini utilizzati durante la conversazione. In alcuni casi, può essere utile fornire informazioni scritte sulla malattia o suggerirgli di preparare a casa un elenco con tutte le domande che vorrà affrontare in occasione della visita successiva (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019).

In base alla presentazione del caso clinico e al percorso diagnostico e terapeutico che si è deciso di intraprendere, i risultati terapeutici possono essere differenti. Nei casi in cui il trattamento abbia dato dei notevoli miglioramenti clinici alcuni proprietari possono farsi prendere da uno stato di euforia, arrivando addirittura a reputare la diagnosi sbagliata o pensare ad una rara “eccezione miracolosa”. Non sempre però un miglioramento clinico corrisponde all'effettiva guarigione. Nel caso in cui l'animale non sia guarito completamente, è importante ricordare che l'animale è ancora malato, anche se l'obiettivo di ripristinare un'adeguata qualità di vita è stato raggiunto (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019).

Quando la situazione dell'animale volge al peggio, il veterinario dovrebbe offrire sostegno alla famiglia ed aiutarla a decidere quando è il momento opportuno per lasciar andare il

proprio animale. Il concetto di qualità della vita è stato ampiamente studiato in medicina umana, ma è relativamente nuovo in medicina veterinaria e finora ha ricevuto poca attenzione anche per la difficoltà di valutare questo parametro in un animale (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019). In oncologia veterinaria, il concetto di qualità della vita è in relazione alla misura in cui gli organi e il benessere di un paziente vengono influenzati dal processo patologico e dai trattamenti ricevuti, nonché dall'abilità del cane di espletare attività della vita quotidiana (Yazbek & Fantoni, 2005).

Tra i parametri maggiormente utilizzati dai diversi autori nella valutazione della qualità della vita (Yazbek & Fantoni, 2005; Villalobos & Kaplan, 2007) possiamo trovare:

- Dolore
- Stato mentale
- Appetito
- Idratazione
- Igiene
- Gioia, reattività nei confronti delle cose che lo circondano, depressione, solitudine, ansia, paura,
- Mobilità
- Salute generale, prevalenza di giorni positivi o negativi

Il monitoraggio di questi parametri durante il trattamento può migliorare la comunicazione tra cliente e veterinario, avendo anche un impatto diretto su varie decisioni, in particolare la scelta delle terapie da applicare o la loro interruzione. Una modalità per coinvolgere il proprietario nella valutazione della qualità della vita è quello di sottoporgli un semplice questionario scritto che comprenda domande le cui risposte siano sì/no o a scelta multipla (Yazbek & Fantoni, 2005). Il questionario proposto da Yazbeck e Fantoni ha dimostrato che le valutazioni riguardanti cani sani di proprietà di veterinari e non veterinari non differivano in modo significativo. L'esito del questionario non è quindi influenzato dall'essere veterinario (Yazbek & Fantoni, 2005). Seppure il giudizio soggettivo non venga completamente eliminato mediante un questionario scritto, può comunque offrire informazioni più precise rispetto al chiedere al proprietario di valutare la qualità della vita del suo animale con una scala da 0 a 10 o con una risposta libera (Yazbek & Fantoni, 2005). Il questionario validato da Yazbeck e Fantoni consiste in dodici domande con

quattro possibili risposte. Ogni domanda è valutata con una scala da zero a tre punti, il punteggio massimo totale è di 36 punti che corrispondono alla migliore qualità di vita mentre all'abbassarsi di questo punteggio si ha un peggioramento della qualità di vita.

Questionario per la valutazione della qualità della vita in cani che presentano segni di dolore secondari ad una patologia neoplastica (Yazbek & Fantoni, 2005):

1. Quanto pensi che la malattia influenzi la qualità della vita del tuo cane?
 - a. Molto (0)
 - b. Abbastanza (1)
 - c. Poco (2)
 - d. Per niente (3)
2. Il cane fa ancora quello che gli piace (es giocare o fare passeggiate)?
 - a. No (0)
 - b. Raramente (1)
 - c. Frequentemente (2)
 - d. In modo normale (3)
3. Com'è lo stato d'animo del tuo cane?
 - a. Totalmente alterato (0)
 - b. Alcuni episodi di alterazione (1)
 - c. Poso alterato (2)
 - d. Normale (3)
4. Il cane mantiene le sue abitudini igieniche (es esempio si pulisce)?
 - a. No (0)
 - b. Raramente (1)
 - c. Meno rispetto a prima (2)
 - d. Si (3)

5. Quanto spesso pensi che il tuo cane provi dolore?
- a. In ogni momento (0)
 - b. Frequentemente (1)
 - c. Raramente (2)
 - d. Mai (3)
6. Il tuo cane ha appetito?
- a. No (0)
 - b. Mangia solo quando costretto, mangierebbe di più quello che gli piace (1)
 - c. Poco (2)
 - d. Normale (3)
7. Il tuo cane si stanca facilmente?
- a. Sì, sempre (0)
 - b. Frequentemente (1)
 - c. Raramente (2)
 - d. No (3)
8. Come dorme il tuo cane?
- a. Molto male, non dorme affatto (0)
 - b. Male (1)
 - c. Quasi normalmente (2)
 - d. Normalmente (3)
9. Quanto spesso vomita il tuo cane?
- a. Sempre (0)
 - b. Frequentemente (1)
 - c. Raramente (2)
 - d. Mai (3)

10. Com'è la funzione intestinale del tuo cane?

- a. Molto alterata (0)
- b. Alterata (1)
- c. Quasi normale (2)
- d. Normale (3)

11. Il tuo cane è in grado di mettersi in posizione per defecare ed urinare?

- a. Non si mette mai in posizione (0)
- b. Raramente si mette in posizione (1)
- c. A volte si mette in posizione (2)
- d. Urina e defeca normalmente (3)

12. Quanta attenzione presta il cane alla famiglia?

- a. È indifferente (0)
- b. Poca attenzione (1)
- c. Più del normale, il cane è bisognoso di attenzione (2)
- d. Non è cambiata (3)

Dal momento che questo questionario è validato per pazienti che presentano patologie neoplastiche, Faustino e Lallo hanno applicato questa valutazione in cani affetti da neoplasie mammarie, confrontando i risultati ottenuti con quelli di cagne sane. Lo scopo del loro studio era quello di determinare se la presenza di noduli mammari influisse sulla qualità di vita (QOL) dei cani e stimarne la morbilità (Faustino e Lallo, 2015). Quello che è emerso è che 15% delle cagne presentavano un punteggio pari a 0, che equivale ad un totale cambiamento della qualità di vita. Circa il 63% delle cagne con tumori mammari presentavano rilevante diminuzione della qualità della vita mentre solo il 36% non presentava alterazioni (Faustino e Lallo, 2015). Gli aspetti della malattia che maggiormente incidono sulla QOL sono lo stadio, le dimensioni, la presenza di ulcerazioni, recidive e metastasi; tuttavia, poco si sa sull'effetto di piccole masse isolate (Faustino e Lallo, 2015). I risultati estrapolati da questo studio dimostrano che anche masse di piccole dimensioni e allo stadio clinico più basso possono portare ad alterazioni della QOL in relazione al dolore (Faustino e Lallo, 2015).

La perdita di un animale è un momento difficile e le emozioni provate in questo periodo possono influenzare direttamente la percezione complessiva del proprietario nei confronti dell'assistenza ricevuta. Quando possibile, la decisione di interrompere il trattamento dovrà essere affrontata con tatto e in maniera graduale. Ciò aiuterà la famiglia ad abituarsi all'idea, a prepararsi a dire addio all'animale e a decidere cosa fare con la salma (cremazione individuale o collettiva, sepoltura). Le eutanasie programmate devono essere pianificate in un ambiente calmo ed intimo, rassicurando il proprietario che l'animale non soffrirà. Una volta eseguita l'eutanasia, bisogna lasciare il proprietario solo con l'animale, concedendogli il tempo per un ultimo saluto (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019).

Sebbene sia importante l'appoggio dimostrato dal veterinario nei confronti dei proprietari che perdono un animale, bisogna considerare anche i livelli di tensione emotiva a cui va incontro il veterinario. Lo stress da compassione è una conseguenza inevitabile dell'empatia e della compassione ed è causato da un depauperamento graduale delle risorse emotive del veterinario (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019). La gestione di animali affetti da una malattia terminale è uno dei fattori che possono portare a stress da compassione i cui segni comprendono perdita di interesse, minore entusiasmo per la professione e disturbi fisici e psicologici (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019). Lo stress da compassione è uno dei motivi principali di abbandono della professione veterinaria ed è quindi importante riconoscerne i segni prima che diventi un problema (Del Castillo Magàn e Barneda, 2019).

APPENDICE

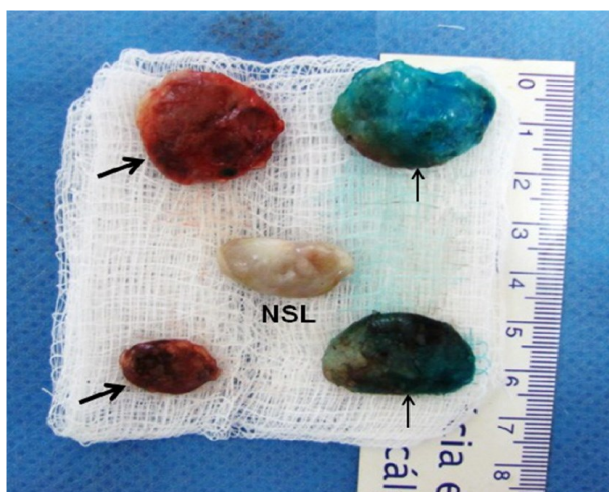


Figura n. 1 – Linfonodi sentinella marcati con emosiderina (frecce spesse), con blu patentato V (frecce sottili) e linfonodi non sentinella (NSL) (Gonzaga et al., 2009)

Tabella n.2 – Tecniche di mappatura del linfonodo sentinella disponibili in oncologia veterinaria (Stefanello et al., 2021)

Tecnica	Strumentazione	Identificazione del linfocentro	Limiti della metodica
Linfografia con colorante vitale	Blu di metilene Blu di isosulfano Blu patentato V	Intra-operatoria previa dissezione della cute	Non consente di evidenziare il linfocentro da valutare; Linfonodo è evidente solo dopo dissezione della cute e dei tessuti peri-linfonodali
Linfografia radiologica indiretta	Radiologico Mezzo di contrasto (olio etiodato; ioexolo)	Pre-operatoria	Esposizione radiologica; Assenza di reperi intraoperatori; Possibili da lievi a modesti effetti collaterali nel sito di inoculo
Linfografia tomografica computerizzata	TC Mezzo di contrasto (olio etiodato; ioexolo)	Pre-operatoria	Esposizione radiologica Assenza di reperi intraoperatori Possibili effetti collaterali da lievi a modesti nel sito di inoculo Costi più elevati rispetto alla radiologia classica
Ultrasonografia contrastografica (CEUS)	Ecografo Mezzo di contrasto per ecografia	Pre-operatoria	Scelta dei linfocentri in cui verificare il raggiungimento del mezzo di contrasto su base anatomica; Assenza di reperi intraoperatori
Linfoscintigrafia	Radiofarmaco (^{99m}TC) Gamma camera Sonda gamma portatile per uso intra-operatorio	Pre-operatoria Intra-operatoria a cute integra	Autorizzazione alla detenzione del radiofarmaco; Radioesposizione; Costi elevati della strumentazione
Fluorescenza (NIR)	Colorante fluorescente (verde indocianina) Sonde con telecamera per rilevazione della fluorescenza	Intra-operatoria a cute integra	Bassa profondità di penetrazione (< 2,5 cm) con necessità di avvalersi di una tecnica pre-operatoria per la identificazione del/dei linfocentri da valutare; Costi delle attrezzature elevati

Classificazione istologica delle displasie e neoplasie mammarie della cagna (Goldschmidt et al., 2011):

Ectasia duttale: dilatazione cistica dei dotti con accumulo di detriti necrotici, macrofagi, materiale lipidico e colesterolo. Può essere secondaria ad occlusione per neoplasia intraduttale.

Iperplasia lobulare (adenosi)

- **Regolare:** proliferazione non neoplastiche dei dotti intralobulari con conseguente aumento del numero di dotti e acini per lobulo. Non sono presenti atipie ma possono essere presenti adiacenti neoplasie mammarie.
- **Con attività secernente** (lattazionale): stesse caratteristiche della regolare ma a formare gli acini ci sono cellule secernenti cubiche che portano all'accumulo di secreto all'interno di acini e dotti. Le cellule degli acini hanno vacuoli intracitoplasmatici.
- **Con fibrosi** (tessuto connettivo fibroso interlobulare): stesse caratteristiche della regolare ma presenza di una maggior quantità di tessuto connettivo fibroso interlobulare.
- **Con atipia:** stesse caratteristiche della regolare ma le cellule epiteliali presentano atipie come ipercromasia nucleare, anisocitosi, anisocariosi, mitosi variabili. Difficile differenziarla dal carcinoma in situ, quando coinvolge una vasta area di tessuto mammario spesso si tratta di iperplasia.

Epiteliosi (iperplasia intraduttale senza atipia): normale proliferazione di cellule epiteliali all'interno del lume dei dotti. Gli aggregati di cellule spesso riempiono il lume del dotto. Presente lieve pleomorfismo nucleare. Le lesioni più grandi possono essere difficili da differenziare dal carcinoma in situ.

Papillomatosi intraduttale: proliferazione papillare epiteliale intraduttale senza supporto fibrovascolare con distribuzione focale o multifocale.

Cambiamento fibroadenomatoso: raro, proliferazione dei dotti intralobulari e dello stroma periduttale, stroma spesso edematoso o mixomatoso. I fibroblasti e le cellule duttali hanno nuclei pleomorfi ed un aumento del numero delle mitosi.

Ginecomastia: ingrossamento delle ghiandole mammarie nel maschio con ectasia duttale ed iperplasia lobulare. Spesso associata a Sertoliomi testicolari.

Adenoma semplice: noduli ben demarcati non infiltrativi, con cellule disposte in tubuli con un singolo strato di cellule che possono contenere una secrezione anfofila amorfa. Da scarso a moderato supporto fibrovascolare, cellule cubiche o colonnari con moderato citoplasma eosinofilo, nucleo centrale rotondo o ovale, cromatina finemente granulare e piccolo nucleolo centrale. Anisocitosi e anisocariosi minime con poche mitosi.

Adenoma papillare intraduttale (papilloma del dotto): pattern di crescita papillare arborizzato supportato da un'asse fibrovascolare. Le papille possono svilupparsi in modo focale o multifocale in più dotti; i dotti adiacenti sono spesso ectasici. Cellule in monostrato con nucleo centrale ovale e scarso citoplasma eosinofilo. Al di sotto si evidenzia uno strato di cellule mioepiteliali. Lo stroma di supporto è costituito da fibroblasti, collagene e vasi sanguigni. Rare mitosi, i dotti possono dilatarsi (citoadenoma papillare), possibili aree di ialinizzazione che circondano elementi epiteliali possono essere erroneamente interpretate come carcinomi.

Adenoma duttale (adenoma basaloide): la massa cresce nel lume del dotto rendendolo ectasico, può essere multifocale coinvolgendo più dotti. Le cellule si organizzano in cordoni con due file distinte di cellule (luminali e basali). La componente luminale è cubica/colonnare con margini relativamente indistinti, scarso citoplasma, nuclei tondi/ovali centrali/basali con prominente nucleolo. Anisocitosi ed anisocariosi minime e poche mitosi. Aree di differenziazione squamosa (differenziazione duttale) sono presenti in modo multifocale con possibile accumulo di detriti cheratinici nel lume dei dotti, mimando il normale cambiamento che si trova tra i dotti prossimali e il seno del capezzolo.

Fibroadenoma: tubuli costituiti da cellule cubiche o colonnari con nuclei tondi ed uniformi, ampio stroma di connettivo lasso ricco di mucopolisaccaridi circonda i tubuli. Le cellule stromali fibroblastiche hanno nuclei allungati, con poco citoplasma e margini indistinti. Neoplasie di più vecchia data possiedono tessuto connettivo fibroso denso e ialinizzazione dello stroma.

Mioepitelioma: raro, cellule fusate disposte in corti fasci frammisti a materiale basofilo fibrillare (matrice mixoide). Le cellule sono scarsamente delimitate con poco citoplasma fibrillare e nucleo tondo ipocromatico con cromatina granulare. Scarse anisocitosi ed

anisocariosi ed indice mitotico basso. Le cellule mioepiteliali possono essere identificate mediante immunoistochimica (positive a SMA, CALP, VIM e p63).

Adenoma complesso (adenomioepitelioma): proliferazione sia epiteliale (tubulare) che mioepiteliale; quantità variabile di stroma fibroso. Anisocariosi ed anisocitosi sono solitamente scarse, associata alla componente mioepiteliale è presente abbondante matrice mixoide.

Tumore misto benigno: proliferazione sia epiteliale (tubulare) che mioepiteliale con aree multifocali di cartilagine e/o osso, quantità variabile di stroma fibroso. Anisocitosi ed anisocariosi minime, associata alla componente mioepiteliale è presente abbondante matrice mixoide. Ci sono diverse teorie sull'origine della componente mesenchimale (metaplasia delle cellule epiteliali, mioepiteliali o interstiziali stromali). L'osso si forma per ossificazione endocondrale della componente cartilaginea oppure intramembranosa del connettivo stromale.

Carcinoma in situ: nodulo/i ben delimitato, non infiltrante (che non invade la membrana basale e lo strato mioepiteliale), costituito da cellule strettamente coese, disposte in tubuli irregolari. Le cellule variano da poligonali a rotonde a cuboidali ed hanno scarso citoplasma eosinofilo ed un elevato rapporto nucleo:citoplasma. Anisocitosi ed anisocariosi sono moderate, le mitosi sono variabili, c'è perdita della polarità cellulare, nucleare e della normale architettura. Spesso ci sono aree di iperplasia lobulari adiacenti al tessuto neoplastico. Può essere difficile distinguere il carcinoma in situ da iperplasia lobulare con grave atipia ed epiteliosi atipica.

Carcinoma semplice: è composto da un solo tipo cellulare derivante dall'epitelio luminale o dal mioepitelio

- **Tubulare:** comuni, cellule disposte in modo tubulare in una o due file, morfologia variabile, nucleoli singoli e grandi oppure multipli e piccoli, citoplasma eosinofilo, margini relativamente distinti, mitosi variabili. Quando le cellule neoplastiche si infiltrano nel tessuto circostante possono causare una risposta stromale con proliferazione miofibroblastica.
- **Tubulo-papillare:** caratteristiche simili al tubulare ma le formazioni neoplastiche tubulari sono disposte in modo peduncolato, papille si estendono nel lume tubulare. Le papille sono sostenute da un sottile stroma connettivale fibrovascolare.

- **Cistico-papillare:** differisce dal tubulare in quanto vi sono papille che si estendono nei lumi tubulari dilatati e cistici i quali possono contenere materiale eosinofilo, finemente flocculato frammisto a granulociti degenerati e macrofagi schiumosi.
- **Cribriforme:** raro, cellule disposte “a setaccio”, si formano lumi piccoli e rotondi, circondati da ponti di cellule neoplastiche. Scarso tessuto connettivo interstiziale, cellule da colonnari a poligonali con scarso citoplasma eosinofilo. Moderata anisocitosi ed anisocariosi, mitosi variabili.

Carcinoma invasivo micropapillare: uno o più noduli intraduttali che formano aggregati irregolari e piccole papille prive di sostegno fibrovascolare, circondate da spazi lacunari vuoti. Le cellule neoplastiche infiltrano lo stroma periduttale, sono pleomorfe con scarso citoplasma eosinofilo. Elevato rapporto nucleo:citoplasma, nuclei ovali centrali, grande nucleolo centrale, cromatina granulare ipercromatica. Anisocitosi ed anisocariosi da moderate a gravi, elevato indice mitotico. Le aree micropapillari infiltranti possono essere associate ad aree tubulopapillari o solide. Frequente invasione vascolare e alto potenziale metastatico.

Carcinoma solido: cellule disposte in cordoni o masse prive di lume, coese che formano lobuli densi e di dimensioni irregolari, supportati da un sottile stroma fibrovascolare. Cellule da poligonali ad ovali spesso con margini poco chiari e citoplasma scarso da leggermente eosinofilo a basofilo. Nuclei ovali con cromatina granulare ed un singolo nucleolo centrale. Anisocariosi ed anisocitosi da moderate a gravi e mitosi variabili. Alla periferia della neoplasia si ha invasione linfatica con possibili metastasi ai linfonodi regionali.

Comedocarcinoma: aree necrotiche centralmente agli aggregati cellulari neoplastici con abbondante materiale amorfo eosinofilo, detriti cellulari, neutrofili degenerati e macrofagi. Le aree non necrotiche sono costituite da cellule coese supportate da un sottile stroma fibrovascolare. Possibile infiltrazione linfatica e metastasi linfonodali.

Carcinoma anaplastico: il più maligno tra i carcinomi, frequente invasione del connettivo interlobulare e dei vasi linfatici, l'origine della neoplasia è spesso difficile da identificare in quanto non sono presenti noduli a livello istopatologico. Le cellule sono spesso isolate o raggruppate in piccoli gruppi. Citoplasma da moderato ad abbondante, nuclei da rotondi ad ovali con cromatina grossolana ed occasionalmente indentati. Nucleoli multipli, anisocariosi ed anisocitosi marcate, frequenti mitosi. Possibili cellule multinucleate,

proliferazione miofibroblastica che può essere accompagnata da infiltrato infiammatorio. Il tessuto interstiziale è spesso edematoso con vasi linfatici ectasici; frequente infiltrazione linfatica e metastasi sia linfonodali che a distanza (Rx polmoni mostra pattern interstiziale piuttosto che nodulare).

Carcinoma che insorge in un adenoma complesso/tumore misto benigno: la controparte benigna è ancora visibile istologicamente, tuttavia, sono presenti focolai di cellule pleomorfe con aumento del numero di mitosi.

Carcinoma complesso: componente epiteliale maligna e componente mioepiteliale benigna. Popolazione epiteliale organizzata in tubuli irregolari rivestiti da uno o più strati di cellule cubiche/colonnari con anisocariosi da moderata a marcata, anisocitosi e variabili mitosi. Possibile presenza di necrosi della popolazione epiteliale con distribuzione focale o multifocale ed occasionali focolai di differenziazione squamosa. La popolazione mioepiteliale è disposta in fasci irregolari all'interno della matrice fibrillare basofila interstiziale. Le cellule mioepiteliali sono scarsamente delimitate e hanno scarso citoplasma, nucleo centrali tondo o ovale con cromatina finemente granulare e nucleolo piccolo centrale. Anisocariosi ed anisocitosi minime. Alla periferia possibile infiltrazione di linfociti e plasmacellule. Si differenziano dagli adenomi complessi per la più elevata cellularità, pleomorfismo della componente epiteliale, elevato indice mitotico, foci necrotici e crescita infiltrativa.

Carcinoma e mioepitelioma maligno: sia componente epiteliale che mioepiteliale maligne. È necessaria l'immunoistochimica per confermare la presenza di entrambe le componenti epiteliale (CK 8,18,19) e mioepiteliale (SMA, CALP, VIM, p63).

Carcinoma misto: raro, componente epiteliale maligna e mesenchimale benigna (cartilagine, osso, tessuto adiposo). Tre o più popolazioni cellulari supportate da uno stroma fibrovascolare. La componente ossea può essere circondata da osteoblasti reattivi ma non neoplastici. Si differenziano dai tumori misti benigni per la maggiore cellularità, pleomorfismo significativo della componente epiteliale, aumento dell'indice mitotico, focolai necrotici e crescita infiltrativa.

Carcinoma duttale: la popolazione neoplastica è disposta in cordoni o tubuli che circondano un fine lume, le cellule presentano anisocitosi ed anisocariosi marcate, sono presenti numerose mitosi. Possono essere presenti foci di differenziazione squamosa e cheratinizzazione con granuli cheratoialini intracitoplasmatici.

Carcinoma papillare intraduttale: proliferazione della popolazione epiteliale con stratificazione di cellule con caratteristiche di malignità (elevato rapporto nucleo:citoplasma, pleomorfismo nucleare e cellulare ed aumento delle mitosi). Spesso associato alla controparte benigna (adenoma papillare intraduttale). Il pattern di crescita intraduttale papillare permette di distinguerlo da un carcinoma complesso.

Carcinoma squamoso: composto esclusivamente da epitelio squamoso, origina dalle cellule squamose del dotto del capezzolo o dall'epitelio duttale che è andato incontro a metaplasia squamosa. Difficile differenziare i carcinomi squamosi della ghiandola mammaria da quelli che originano dalla cute ed invadono la ghiandola sottostante. Presenza di filamenti di cheratina all'interno delle cellule ed infiltrato infiammatorio marcato, acuto o cronico.

Carcinoma adenosquamoso: aree di carcinoma di qualsiasi tipo frammiste a foci di carcinoma squamoso.

Carcinoma mucinoso: forma rara, abbondante produzione di mucina, le cellule neoplastiche possono essere isolate o formare tubuli o nidi.

Carcinoma ricco di lipidi (secretorio): in cagne giovani intere. Cellule rotonde o ovali con abbondante citoplasma contenente numerosi piccoli vacuoli o uno grande che può spostare il nucleo alla periferia. Nuclei vescicolari, con cromatina addensata e 1 o 2 nucleoli. Anisocitosi ed anisocariosi da moderate a gravi con mitosi variabili. Possibili foci necrotici, invasione linfatica e metastasi linfonodali.

Carcinomi a cellule fusate: spesso è necessaria l'immunoistochimica per differenziarli dai sarcomi

- **Mioepitelioma maligno:** cellule ovali o fusate. Le cellule ovali spesso sono poco delimitate con moderato citoplasma basofilo o eosinofilo, occasionali vacuoli intracitoplasmatici, nucleo rotondo centrale, cromatina finemente granulare, singolo nucleolo. Attorno presenza di materiale fibrillare basofilo. Anisocitosi, anisocariosi e mitosi variabili. Le cellule fusate hanno nuclei vescicolari fusiformi, ampio citoplasma eosinofilo, margini distinti, anisocitosi ed anisocariosi abbondanti, variabili mitosi. L'immunoistochimica per la ricerca di markers quali SMA, CALP, VIM e p63 è necessaria per confermare la presenza della componente mioepiteliale.

- **Carcinoma squamoso variante a cellule fusate:** isole e cordoni di cellule epiteliali supportate da un fine stroma fibroso. Cellule e nuclei sono grandi e fusiformi, presenza di filamenti intracitoplasmatici di cheratina, focolai irregolari di differenziazione squamosa.
- **Carcinoma variante a cellule fusate:** prevalenza di cellule fusiformi. Isole o cordoni di cellule epiteliali, spesso associate ad aree di carcinoma tubulare. Cellule e nuclei fusiformi, spesso nucleolo prominente, assenza di filamenti di cheratina nel citoplasma, moderata anisocariosi ed anisocitosi, mitosi variabili. Origine epiteliale confermata da immunoistochimica.

Carcinoma infiammatorio: presentazione improvvisa, decorso clinico fulminante, edema, eritema, calore della mammella, presenza o meno di noduli. Invasione dei linfatici dermici da parte di emboli neoplastici, occlusione dei linfatici porta a grave edema.

Osteosarcoma: forma mesenchimale più comune, spesso rapida crescita in seguito alla presenza della massa da diverso tempo. All'interno della massa proliferazione di cellule che variano da fusiformi a stellate ad ovoidali, associate ad isole di osteoide o osso. Mitoi frequenti, metastasi principalmente per via ematogena (spt polmoni).

Condrosarcoma: poco comune, spesso multilobato. Le cellule alla periferia dei lobuli sono spesso binucleate o multinucleate. Nuclei di forma irregolare e nucleoli prominenti, mitosi variabili, più comuni nelle forme meno differenziate. Quantità variabile di matrice condroide basofila.

Fibrosarcoma: forma rara che può insorgere a partire da una neoplasia preesistente della ghiandola o dallo stroma interstiziale. Cellule neoplastiche fusiformi con margini poco distinti, scarso citoplasma fibrillare eosinofilo, nuclei ovali con cromatina finemente granulare e nucleoli variabili. Anisocitosi ed anisocariosi da moderate a gravi e frequenti mitosi. L'immunoistochimica permette di differenziarlo da un mioepitelioma maligno o un carcinoma a cellula fusate. Si deve, inoltre, differenziare da un emangiopericitoma che spesso insorge ventralmente al torace o all'addome.

Emangiosarcoma: caratteristiche istopatologiche simili a quelli riscontrabili nella milza o nel sottocute.

Carcinosarcoma (tumore misto maligno): poco comune, spesso si presenta come un carcinoma o un osteosarcoma. Sia la componente epiteliale che quella mesenchimale

sono maligne, la prima metastatizza attraverso la via linfatica mentre la seconda per via ematogena.

Adenoma e carcinoma del capezzolo: rare neoplasie che coinvolgono solamente il tessuto del capezzolo, il capezzolo risulta ingrossato e duro. All'interno del tessuto neoplastico i dotti sono costituiti da uno o più strati di cellule epiteliali ed i lumi spesso risultano schiacciati. Le cellule epiteliali presentano scarso pleomorfismo (adenoma) oppure formano aggregati all'interno dei lumi duttali con anisocitosi ed anisocariosi (carcinomi)

Carcinoma con infiltrazione epidermica del capezzolo: occasionale, la ghiandola mammaria ospita un carcinoma, da questo singole cellule o piccoli aggregati si infiltrano all'interno dell'epidermide del capezzolo.

Melanosi della pelle del capezzolo: proliferazione simil-lentiginosa dei melanociti all'interno dell'epidermide. La lesione è focale e circonda i dotti del capezzolo. L'epidermide è leggermente iperplastica, nello strato basale c'è un aumento del numero dei melanociti che formano piccoli gruppi. C'è un aumento della melanina all'interno del citoplasma dei cheratinociti nello strato basale e spinoso ed occasionali melanofagi nel derma.

BIBLIOGRAFIA

- Arenas C, Peña L, Granados-Soler JL, Pérez-Alenza MD. Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study. *Vet Rec.* 2016 Jul 30;179(5):125. doi: 10.1136/vr.103398. Epub 2016 Jul 4. PMID: 27377395.
- Bakirel T, Alkan FÜ, Üstüner O, Çınar S, Yildirim F, Erten G, Bakirel U. Synergistic growth inhibitory effect of deracoxib with doxorubicin against a canine mammary tumor cell line, CMT-U27. *J Vet Med Sci.* 2016 May 3;78(4):657-68. doi: 10.1292/jvms.15-0387. Epub 2016 Jan 29. PMID: 26822118; PMCID: PMC4873858.
- Banchi P, Morello EM, Bertero A, Ricci A, Rota A. A retrospective study and survival analysis on bitches with mammary tumours spayed at the same time of mastectomy. *Vet Comp Oncol.* 2021 Aug 5. doi: 10.1111/vco.12759. Epub ahead of print. PMID: 34351034.
- Beer, P., Pozzi, A., Rohrer Bley, C., Bacon, N., Pfammatter, N. S., & Venzin, C. (2018). The role of sentinel lymph node mapping in small animal veterinary medicine: A comparison with current approaches in human medicine. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16(2), 178–187. <https://doi.org/10.1111/vco.12372>
- Benavente, M. A., Bianchi, C. P., & Aba, M. A. (2019). Expression of Oxytocin Receptors in Canine Mammary Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 170, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.05.005>
- Brissot, H. N., & Edery, E. G. (2016). Use of indirect lymphography to identify sentinel lymph node in dogs: a pilot study in 30 tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(3), 740–753. <https://doi.org/10.1111/vco.12214>
- Burrai, G. P., Gabrieli, A., Moccia, V., Zappulli, V., Porcellato, I., Brachelente, C., Pirino, S., Polinas, M., & Antuofermo, E. (2020). A statistical analysis of risk factors and biological behavior in canine mammary tumors: A multicenter study. *Animals*, 10(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ani10091687>
- Canadas, A., França, M., Pereira, C., Vilaça, R., Vilhena, H., Tinoco, F., ... Santos, M. (2019). Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study. *Veterinary Pathology*, 56(2), 208–219. <https://doi.org/10.1177/0300985818806968>
- Cassali, G. D., de CAMPOS, C. B., Bertagnolli, A. C., Estrela-Lima, A., Lavallo, G. E., Damasceno, K. A., DE NARDI, A. B., Cogliati, B., da Costa, F. V. A., Sobral, R., Di Santis, G. W., Fernandes, C. G., Ferreira, E., Salgado, B. S., Vieira-Filho, C. H. da C., Silva, D. N., Martins-Filho, E. F., Teixeira, S. V., Nunes, F. C., & Nakagaki, K. Y. R. (2014). Consensus

for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 55(2), 38–69. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.135084>

Chang, S. C., Chang, C. C., Chang, T. J., & Wong, M. L. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 Cases (1998-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(10), 1625–1629. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1625>

Collivignarelli, F., Tamburro, R., Aste, G., Falerno, I., Signore, F. Del, Simeoni, F., Patsikas, M., Gianfelici, J., Terragni, R., Attorri, V., Carluccio, A., & Vignoli, M. (2021). Lymphatic drainage mapping with indirect lymphography for canine mammary tumors. *Animals*, 11(4), 1–9. <https://doi.org/10.3390/ani11041115>

De Andrés PJ, Cáceres S, Clemente M, Pérez-Alenza MD, Illera JC, Peña L. Profile of Steroid Receptors and Increased Aromatase Immunoexpression in Canine Inflammatory Mammary Cancer as a Potential Therapeutic Target. *Reprod Domest Anim*. 2016 Apr;51(2):269-75. doi: 10.1111/rda.12676. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26899138.

De Araújo MR, Campos LC, Ferreira E, Cassali GD. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. *J Vet Intern Med*. 2015 Sep-Oct;29(5):1360-7. doi: 10.1111/jvim.13576. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26130166; PMCID: PMC4858035.

De Campos, C. B., Lavalle, G. E., Monteiro, L. N., Arantes Pêgas, G. R., Fialho, S. L., Balabram, D., & Cassali, G. D. (2018). Adjuvant thalidomide and metronomic chemotherapy for the treatment of canine malignant mammary gland neoplasms. *In Vivo*, 32(6), 1659–1666. <https://doi.org/10.21873/invivo.11429>

Del Castillo Magàn N., Barneda R.R., Guida all'oncologia del cane e del gatto. Edra. 2019

Dellman H.D., Eurell J.A. Istologia e anatomia microscopica veterinaria. Casa Editrice Ambrosiana, 2000

De M Souza CH, Toledo-Piza E, Amarin R, Barboza A, Tobias KM. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Can Vet J*. 2009 May;50(5):506-10. PMID: 19436636; PMCID: PMC2671873.

Devassy JG, Nwachukwu ID, Jones PJ. Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutr Rev*. 2015 Mar;73(3):155-65. doi: 10.1093/nutrit/nuu064. Epub 2015 Feb 13. PMID: 26024538.

- Doré M, Lanthier I, Sirois J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2003 Mar;40(2):207-12. doi: 10.1354/vp.40-2-207. PMID: 12637762.
- Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G, Testo di anatomia veterinaria. Antonio Delfino Editore, 2010
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer, I: the value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403–410.9.
- Emanuelli, M. P., Kommers, G. D., Antoniazzi, A. Q., Bernardes, F. C. S., Lopes, S. T. A., & Figuera, R. A. (2020). Myoepithelial cells and extracellular matrix in the cytologic differentiation of canine mammary tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, 49(3), 451–458. <https://doi.org/10.1111/vcp.12894>
- Faustino, L. C., & Lallo, M. A. (2015). Quality of life and pain in dogs with early-stage mammary tumours. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(4), 451–457. <https://doi.org/10.1556/004.2015.042>
- Favril, S., Stock, E., Hernot, S., Hesta, M., Polis, I., Vanderperren, K., & de Rooster, H. (2019). Sentinel lymph node mapping by near-infrared fluorescence imaging and contrast-enhanced ultrasound in healthy dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 17(1), 89–98. <https://doi.org/10.1111/vco.12449>
- Feliciano, M. A.R., Vicente, W. R. R., & Silva, M. A. M. (2012). Conventional and Doppler ultrasound for the differentiation of benign and malignant canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*, 53(6), 332–337. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2012.01227.x>
- Feliciano, M.A.R., Uscategui, R. A. R., Maronezi, M. C., Simões, A. P. R., Silva, P., Gasser, B., Pavan, L., Carvalho, C. F., Canola, J. C., & Vicente, W. R. R. (2017). Ultrasonography methods for predicting malignancy in canine mammary tumors. *PLoS ONE*, 12(5), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178143>
- Fossum T.W., et al. *Small Animal Surgery – 5th Edition* (2019). Elsevier. Parte II – Chirurgia dei tessuti molli. Neoplasie della mammella. pp. 794-799
- Fournier, Q., Cazzini, P., Bavcar, S., Pecceu, E., Ballber, C., & Elders, R. (2018). Investigation of the utility of lymph node fine-needle aspiration cytology for the staging of malignant solid tumors in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 47(3), 489–500. <https://doi.org/10.1111/vcp.12636>
- Fournier, Q., Thierry, F., Longo, M., Malbon, A., Cazzini, P., Bisson, J., Woods, S., Liuti, T., & Bavcar, S. (2021). Contrast-enhanced ultrasound for sentinel lymph node mapping in the

routine staging of canine mast cell tumours: A feasibility study. *Veterinary and Comparative Oncology*, 19(3), 451–462. <https://doi.org/10.1111/vco.12647>

Gabai V, Venanzi FM, Bagashova E, Rud O, Mariotti F, Vullo C, Catone G, Sherman MY, Concetti A, Chursov A, Latanova A, Shcherbinina V, Shifrin V, Shneider A. Pilot study of p62 DNA vaccine in dogs with mammary tumors. *Oncotarget*. 2014 Dec 30;5(24):12803-10. doi: 10.18632/oncotarget.2516. PMID: 25296974; PMCID: PMC4350343.

Gattino F, Maniscalco L, Iussich S, Biasato I, Martano M, Morello E, Gola C, Millán Ruiz Y, Saeki N, Buracco P, Martín de Las Mulas J, De Maria R. PDGFR- α , PDGFR- β , VEGFR-2 and CD117 expression in canine mammary tumours and evaluation of the in vitro effects of toceranib phosphate in neoplastic mammary cell lines. *Vet Rec*. 2018 Aug 18;183(7):221. doi: 10.1136/vr.104414. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29440590.

Goldschmidt, M. H., Peña, L., Rasotto, R., & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 117–131. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>

Goldschmidt M. H., Peña L., Zappulli V. Tumors of the mammary gland. *Da Tumors in Domestic Animals*, Edited by Donald J. Meuten. 5th Edition 2017

Gonzaga, L., Pinheiro, P., Santos, R., Filho, D. O., Henrique, P., Vasques, D., & Oliveira, P. H. De. (2009). Models, Biological Hemossiderina: Um novo marcador para identificação do linfonodo sentinela. *Acta Cirurgica Brasileira*, 24(6), 432–436. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502009000600002>

Gooding AJ, Schiemann WP. Epithelial-Mesenchymal Transition Programs and Cancer Stem Cell Phenotypes: Mediators of Breast Cancer Therapy Resistance. *Mol Cancer Res*. 2020 Sep;18(9):1257-1270. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0067. Epub 2020 Jun 5. PMID: 32503922; PMCID: PMC7483945.

Grayton JE, Miller T, Wilson-Robles H. In vitro evaluation of Selective Inhibitors of Nuclear Export (SINE) drugs KPT-185 and KPT-335 against canine mammary carcinoma and transitional cell carcinoma tumor initiating cells. *Vet Comp Oncol*. 2017 Dec;15(4):1455-1467. doi: 10.1111/vco.12289. Epub 2017 Jan 30. PMID: 28133930.

Guil-Luna, S., Millán, Y., De Andres, J., Rollón, E., Domingo, V., García-Macías, J., Sánchez-Céspedes, R., & Martín de las Mulas, J. (2017). Prognostic impact of neoadjuvant aglepristone treatment in clinicopathological parameters of progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(2), 391–399. <https://doi.org/10.1111/vco.12175>

- Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, Devauchelle P, Leblanc A, Legendre A, Powers B, Leventhal PS, Kinet JP, Palmerini F, Dubreuil P, Moussy A, Hermine O. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med.* 2008 Nov-Dec;22(6):1301-9. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0190.x. Epub 2008 Sep 24. Erratum in: *J Vet Intern Med.* 2009 Jan-Feb;23(1):224. Ogilvie, G [corrected to Ogilvie, G]. PMID: 18823406.
- Hermo GA, Turic E, Angelico D, Scursoni AM, Gomez DE, Gobello C, Alonso DF. Effect of adjuvant perioperative desmopressin in locally advanced canine mammary carcinoma and its relation to histologic grade. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2011 Jan-Feb;47(1):21-7. doi: 10.5326/JAAHA-MS-5509. Epub 2010 Dec 16. PMID: 21164169.
- Hurst EA, Pang LY, Argyle DJ. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor mavacoxib (Trocoxil) exerts anti-tumour effects in vitro independent of cyclooxygenase-2 expression levels. *Vet Comp Oncol.* 2019 Jun;17(2):194-207. doi: 10.1111/vco.12470. Epub 2019 Mar 13. PMID: 30767381.
- Kamstock, D. A., Ehrhart, E. J., Getzy, D. M., Bacon, N. J., Rassnick, K. M., Moroff, S. D., Liu, S. M., Straw, R. C., McKnight, C. A., Amorim, R. L., Bienzle, D., Cassali, G. D., Cullen, J. M., Dennis, M. M., Esplin, D. G., Foster, R. A., Goldschmidt, M. H., Gruber, A. D., Hellmén, E., ... Kiupel, M. (2011). Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimens in veterinary surgical pathology. *Veterinary Pathology*, 48(1), 19–31. <https://doi.org/10.1177/0300985810389316>
- Karayannopoulou, M., Koutinas, A. F., Polizopoulou, Z. S., Roubies, N., Fytianou, A., Saridomichelakis, M. N., & Kaldrymidou, E. (2003). Total serum alkaline phosphatase activity in dogs with mammary neoplasms: A prospective study on 79 natural cases. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 50(10), 501–505. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00591.x>
- Karayannopoulou, M., Polizopoulou, Z. S., Koutinas, A. F., Fytianou, A., Roubies, N., Kaldrymidou, E., Tsioli, V., Patsikas, M. N., Constantinidis, T. C., & Koutinas, C. K. (2006). Serum alkaline phosphatase isoenzyme activities in canine malignant mammary neoplasms with and without osseous transformation. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(3), 287–290. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2006.tb00132.x>
- Klopfleisch, R., & Gruber, A. D. (2009). Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. *Veterinary Pathology*, 46(3), 416–422. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0212-K-FL>

- Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S. S., Gärtner, F., & Gruber, A. D. (2011). Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: News from an old disease. *Veterinary Pathology*, 48(1), 98–116. <https://doi.org/10.1177/0300985810390826>
- Kristiansen, V. M., Peña, L., Díez Córdova, L., Illera, J. C., Skjerve, E., Breen, A. M., Cofone, M. A., Langeland, M., Teige, J., Goldschmidt, M., & Sørenmo, K. U. (2016). Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(1), 230–241. <https://doi.org/10.1111/jvim.13812>
- Kubo K, Matsuyama S, Katayama K, Tsutsumi C, Yonezawa K, Shimada T, Kotani T, Sakuma S, Ohashi F, Takamori Y. Frequent expression of the c-kit proto-oncogene in canine malignant mammary tumor. *J Vet Med Sci*. 1998 Dec;60(12):1335-40. doi: 10.1292/jvms.60.1335. PMID: 9879535.
- Langenbach A, McManus PM, Hendrick MJ, Shofer FS, Sorenmo KU. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. *J Am Vet Med Assoc*. 2001 May 1;218(9):1424-8. doi: 10.2460/javma.2001.218.1424. PMID: 11345304.
- Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY, Kweon OK. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J Vet Sci*. 2004 Mar;5(1):63-9. PMID: 15028887.
- Levi M., Sarli G., Benazzi C., Brunetti B. Patologia delle neoplasie mammarie della cagna e della gatta: stato dell'arte. *Veterinaria*. Anno 30, numero 1, febbraio 2016.
- Lurie, D. M., Seguin, B., Schneider, P. D., Verstraete, F. J., & Wisner, E. R. (2006). Contrast-assisted ultrasound for sentinel lymph node detection in spontaneously arising canine head and neck tumors. *Investigative Radiology*, 41(4), 415–421. <https://doi.org/10.1097/01.rli.0000201230.29925.95>
- Mainenti, M., Rasotto, R., Carnier, P., & Zappulli, V. (2014). Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *Veterinary Journal*, 202(1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.003>
- Manfredi, M., De Zani, D., Chiti, L. E., Ferrari, R., Stefanello, D., Giudice, C., Pettinato, V., Longo, M., Di Giancamillo, M., & Zani, D. D. (2021). Preoperative planar lymphoscintigraphy allows for sentinel lymph node detection in 51 dogs improving staging accuracy: Feasibility and pitfalls. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 62(5), 602–609. <https://doi.org/10.1111/vru.12995>

- Marconato L., Foglia A. (2021). Il linfonodo regionale in oncologia veterinaria: sorvegliato speciale. *Veterinaria*. Anno 35, numero 1, febbraio 2021.
- Marconato, L., Romanelli, G., Stefanello, D., Giacoboni, C., Bonfanti, U., Bettini, G., Finotello, R., Verganti, S., Valenti, P., Ciaramella, L., & Zini, E. (2009). Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(8), 967–972. <https://doi.org/10.2460/javma.235.8.967>
- Miller M.E., Evans H.E., De Lahunta A. *Miller's Anatomy of the Dog*. Saunders. 2012
- Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP: Histological classification of mammary tumours of the dog and the cat, Vol VII, 2nd series. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington D.C, and the World Health Organization Collaborating Centre for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999; pp 1-59.
- Misdorp W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Ames, IA: Iowa State Press; 2002:575–606.18.
- Nykamp S., Randall E. *Diagnostica per immagini oncologica*. Da Withrow and MacEwen's *Small Animal Clinical Oncology*, 6th Edition. Elsevier 2020
- Ochiai K, Azakami D, Morimatsu M, Hirama H, Kawakami S, Nakagawa T, Michishita M, Egusa AS, Sasaki T, Watanabe M, Omi T. Endogenous Leu332Gln mutation in p53 disrupts the tetramerization ability in a canine mammary gland tumor cell line. *Oncol Rep*. 2018 Jul;40(1):488-494. doi: 10.3892/or.2018.6409. Epub 2018 May 2. PMID: 29750295.
- Otoni, C. C., Rahal, S. C., Vulcano, L. C., Ribeiro, S. M., Hette, K., Giordano, T., Doiche, D. P., & Amorim, R. L. (2010). Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), 6–9. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-20>
- Patsikas, M. N., & Dessiris, A. (1996a). The Lymph Drainage of the Mammary Glands in the Bitch: A Lymphographic Study. Part I: The 1st, 2nd, 4th and 5th Mammary Glands. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 25(2), 131–138. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1996.tb00071.x>
- Patsikas, M. N., & Dessiris, A. (1996b). The Lymph Drainage of the Mammary Glands in the Bitch: A Lymphographic Study. Part II: The 3rd Mammary Gland. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 25(2), 139–143. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1996.tb00072.x>
- Patsikas, M. N., Karayannopoulou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou, L. G., Papadopoulou, P. L., Tzegas, S. I., Tziris, N. E., Kaitzis, D. G., Dimitriadis, A. S., & Dessiris, A. K. (2006). The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: A lymphographic study.

Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia, 35(4), 228–234.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2005.00664.x>

- Peña, L., De Andrés, P. J., Clemente, M., Cuesta, P., & Pérez-Alenza, M. D. (2012). Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics. *Veterinary Pathology*, 50(1), 94–105.
<https://doi.org/10.1177/0300985812447830>
- Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M. H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Díez, L., Gärtner, F., Hellmén, E., Kiupel, M., Millán, Y., Miller, M. A., Nguyen, F., Poli, A., Sarli, G., Zappulli, V., & de las Mulas, J. M. (2014). Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 51(1), 127–145. <https://doi.org/10.1177/0300985813509388>
- Pereira, C. T., Rahal, S. C., De Carvalho Balieiro, J. C., & Ribeiro, A. A. C. M. (2003). Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: Can it really be altered? *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 32(5), 282–290. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0264.2003.00485.x>
- Pereira, C. T., Marques, F. L. N., Williams, J., Martin, B. W. De, & Bombonato, P. P. (2008). ^{99m}Tc-labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 49(5), 487–491. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2008.00414.x>
- Pierini, A., Millanta, F., Zanforlin, R., Vannozzi, I., & Marchetti, V. (2017). Usefulness of cytologic criteria in ultrasound-guided fine-needle aspirates from subcentimeter canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(6), 869–873.
<https://doi.org/10.1177/1040638717718886>
- Queiroga, F. L., Pérez-Alenza, M. D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C., & Illera, J. C. (2005). Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94(1-3 SPEC. ISS.), 181–187.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.014>
- Randall, E. K., Jones, M. D., Kraft, S. L., & Worley, D. R. (2020). The development of an indirect computed tomography lymphography protocol for sentinel lymph node detection in head and neck cancer and comparison to other sentinel lymph node mapping techniques. *Veterinary and Comparative Oncology*, 18(4), 634–644. <https://doi.org/10.1111/vco.12585>
- Ranieri, G., Pantaleo, M., Piccinno, M., Roncetti, M., Mutinati, M., Marech, I., Patruno, R., Rizzo, A., & Sciorsci, R. L. (2013). Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in human and pet tumours

- with special reference to breast cancer: A comparative review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 88(2), 293–308. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.05.009>
- Rasotto, R., Berlato, D., Goldschmidt, M. H., & Zappulli, V. (2017). Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Veterinary Pathology*, 54(4), 571–578. <https://doi.org/10.1177/0300985817698208>
- Rasotto, R., Goldschmidt, M. H., Castagnaro, M., Carnier, P., Caliar, D., & Zappulli, V. (2014). The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. *Journal of Comparative Pathology*, 151(2–3), 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.04.013>
- Rivera, P. J., Melin, M., Biagi, T., Fall, T., Häggström, J., Lindblad-Toh, K., & Von Euler, H. (2009). Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research*, 69(22), 8770–8774. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1725>
- Rivera, P., & von Euler, H. (2011). Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 132–146. <https://doi.org/10.1177/0300985810387939>
- Rodo A, Malicka E. Immunohistochemical expression of protein p53 in neoplasms of the mammary gland in bitches. *Pol J Vet Sci*. 2008;11(2):89-95. PMID: 18683536.
- Rossi, F., Sabattini, S., Vascellari, M., & Marconato, L. (2018). The impact of toceranib, piroxicam and thalidomide with or without hypofractionated radiation therapy on clinical outcome in dogs with inflammatory mammary carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16(4), 497–504. <https://doi.org/10.1111/vco.12407>
- Rossi, F., Körner, M., Suárez, J., Carozzi, G., Meier, V. S., Roos, M., & Rohrer Bley, C. (2018). Computed tomographic-lymphography as a complementary technique for lymph node staging in dogs with malignant tumors of various sites. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 59(2), 155–162. <https://doi.org/10.1111/vru.12569>
- Santos, A. A., Lopes, C. C., Ribeiro, J. R., Martins, L. R., Santos, J. C., Amorim, I. F., ... Matos, A. J. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: A multivariable survival study. *BMC Veterinary Research*, 9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-1>
- Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst*. 1969 Dec;43(6):1249-61. PMID: 4319248.
- Setoguchi, A., Sakai, T., Okuda, M., Minehata, K., Yazawa, M., Ishizaka, T., ... Tsujimoto, H. (2001). Aberrations of the p63 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 62(3), 433–439. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.433>

- Simon, D., Schoenrock, D., Nolte, I., Baumgärtner, W., Barron, R., & Mischke, R. (2009). Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: Diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(4), 521–528. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00150.x>
- Sleeckx, N., de Rooster, H., Veldhuis Kroeze, E. J. B., van Ginneken, C., & van Brantegem, L. (2011). Canine mammary tumours, an Overview. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(6), 1112–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x>
- Sorenmo, K. U., Kristiansen, V. M., Cofone, M. A., Shofer, F. S., Breen, A. M., Langeland, M., Mongil, C. M., Grondahl, A. M., Teige, J., & Goldschmidt, M. H. (2009). Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(3), 162–172. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00184.x>
- Sorenmo, K. U., Rasotto, R., Zappulli, V., & Goldschmidt, M. H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48(1), 85–97. <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>
- Sorenmo, Karin U., Durham, A. C., Radaelli, E., Kristiansen, V., Peña, L., Goldschmidt, M. H., & Stefanovski, D. (2019). The estrogen effect; Clinical and histopathological evidence of dichotomous influences in dogs with spontaneous mammary carcinomas. *PLoS ONE*, 14(10), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224504>
- Sorenmo K, Durham AC, Evans B, Scavello H, Stefanovski D. A prospective randomized trial of desmopressin in canine mammary carcinoma. *Vet Comp Oncol*. 2020 Dec;18(4):796-803. doi: 10.1111/vco.12619. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32441479.
- Sorenmo K.U., Worley D.R., Zappulli V. (2020) Tumori della ghiandola mammaria. Da Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 6th Edition. Elsevier 2020
- Soultani, C., Patsikas, M. N., Karayannopoulou, M., Jakovljevic, S., Chrysosgonidis, I., Papazoglou, L., Papaioannou, N., Papadopoulou, P., Pavlidou, K., Ilia, G. M., Kaitzis, D. G., & Ilia, T. M. (2016). Assessment of Sentinel Lymph Node Metastasis in Canine Mammary Gland Tumors Using Computed Tomographic Indirect Lymphography. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 58(2), 186–196. <https://doi.org/10.1111/vru.12460>
- Stefanello D., Ferrari R., Zani D.D. (2021). Il linfonodo sentinella: come e perché. La nuova sfida in oncologia chirurgica veterinaria. *Veterinaria*. Anno 35, numero 1, febbraio 2021.

- Stockhaus, C., Kohn, B., Rudolph, R., Brunnberg, L., & Giger, U. (1999). Correlation of haemostatic abnormalities with tumour stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. *Journal of Small Animal Practice*, 40(7), 326–331. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1999.tb03090.x>
- Stratmann, N., Failing, K., Richter, A., & Wehrend, A. (2008). Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Veterinary Surgery*, 37(1), 82–86. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2007.00351.x>
- Szczubiał, M., & Łopuszynski, W. (2011). Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9(4), 296–303. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00268.x>
- Szweda M, Rychlik A, Babińska I, Pomianowski A. Significance of Cyclooxygenase-2 in Oncogenesis. *J Vet Res*. 2019 Jun 12;63(2):215-224. doi: 10.2478/jvetres-2019-0030. PMID: 31276061; PMCID: PMC6598184.
- Tamura D, Saito T, Murata K, Kawashima M, Asano R. Celecoxib exerts antitumor effects in canine mammary tumor cells via COX-2-independent mechanisms. *Int J Oncol*. 2015 Mar;46(3):1393-404. doi: 10.3892/ijo.2015.2820. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25571853.
- Tavares, W. L. F., Lavalle, G. E., Figueiredo, M. S., Souza, A. G., Bertagnolli, A. C., Viana, F. A. B., Paes, P. R. O., Carneiro, R. A., Cavalcanti, G. A. O., Melo, M. M., & Cassali, G. D. (2010). Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-67>
- Tecles, F., Caldin, M., Zanella, A., Membiela, F., Tvarijonavičiute, A., Subiela, S. M., & Josè Ceròn, J. (2009). Serum acute phase protein concentrations in female dogs with mammary tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0282.x>
- Thumser-Henner, P.; Nytko, K.J.; Rohrer Bley, C. (2020) Mutations of BRCA2 in canine mammary tumors and their targeting potential in clinical therapy. *BMC Vet. Res*. 2020, 16, 30.
- Tran, C. M., Moore, A. S., & Frimberger, A. E. (2016). Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14(3), 252–262. <https://doi.org/10.1111/vco.12092>
- Tremont A, Lu J, Cole JT. Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. *Ochsner J*. 2017 Winter;17(4):405-411. PMID: 29230126; PMCID: PMC5718454.

- Valdivia G, Alonso-Diez Á, Pérez-Alenza D, Peña L. From Conventional to Precision Therapy in Canine Mammary Cancer: A Comprehensive Review. *Front Vet Sci.* 2021 Feb 17;8:623800. doi: 10.3389/fvets.2021.623800. PMID: 33681329; PMCID: PMC7925635.
- Venanzi FM, Gabai V, Mariotti F, Magi GE, Vullo C, Sufianov AA, Kolesnikov SI, Shneider A. p62-DNA-encoding plasmid reverts tumor grade, changes tumor stroma, and enhances anticancer immunity. *Aging (Albany NY).* 2019 Nov 21;11(22):10711-10722. doi: 10.18632/aging.102486. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31754084; PMCID: PMC6914433.
- Villalobos A., Kaplan L. Canine and feline geriatric oncology. Honouring the human-animal bond. Blackwell Publishing 2007
- Withers SS, York D, Johnson E, Al-Nadaf S, Skorupski KA, Rodriguez CO Jr, Burton JH, Guerrero T, Sein K, Wittenburg L, Rebhun RB. In vitro and in vivo activity of liposome-encapsulated curcumin for naturally occurring canine cancers. *Vet Comp Oncol.* 2018 Dec;16(4):571-579. doi: 10.1111/vco.12424. Epub 2018 Aug 8. PMID: 30088848; PMCID: PMC6234083.
- Withrow and MachEwen's Small Animal Clinical Oncology, 6th Edition 2020
- Worley, D. R. (2014). Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. *Veterinary and Comparative Oncology*, 12(3), 215–226. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00354.x>
- Xavier PLP, Cordeiro YG, Rochetti AL, Sangalli JR, Zuccari DAPC, Silveira JC, Bressan FF, Fukumasu H. ZEB1 and ZEB2 transcription factors are potential therapeutic targets of canine mammary cancer cells. *Vet Comp Oncol.* 2018 Dec;16(4):596-605. doi: 10.1111/vco.12427. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30047225.
- Yazbek, K. V. B., & Fantoni, D. T. (2005). Validity of a health-related quality-of-life scale for dogs with signs of pain secondary to cancer. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(8), 1354–1358. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1354>
- <https://www.clinicaveterinariasanmarco.it/istopatologia-e-immunoistochimica/>