



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

Il linfonodo sentinella nella chirurgia oncologica dei piccoli
animali: conoscenze attuali e apporto casistico

*The sentinel lymph node in small animal surgical oncology:
current knowledge and clinical experience*

Relatore

Prof. Giulia Maria De Benedictis

Correlatore

Dott. Biagio Rametta

Laureanda

Valentina Gri

Matricola n. 1205829

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

ABSTRACT	4
RIASSUNTO	6
1. INTRODUZIONE	8
1.1. PRINCIPI DI CHIRURGIA ONCOLOGICA.....	10
1.1.1. CONSIDERAZIONI PREOPERATORIE	11
<i>SEGNALAMENTO</i>	11
<i>STADIAZIONE</i>	12
<i>TERAPIA MULTIMODALE</i>	13
<i>APPROCCIO CHIRURGICO</i>	15
1.1.2. TRATTAMENTI PALLIATIVI	16
<i>TRATTAMENTO CHIRURGICO A FINI PALLIATIVI</i>	17
2. I LINFONODI E IL CONCETTO DI LINFONODO SENTINELLA	18
2.1. STRUTTURA	19
2.2. LINFONODO REGIONALE VS LINFONODO SENTINELLA	21
2.3. PERCHE' RICERCARE IL LINFONODO SENTINELLA?	24
3. METODI DI IDENTIFICAZIONE DEL LINFONODO SENTINELLA	25
3.1. TECNICHE PREOPERATORIE.....	28
3.2. TECNICHE INTRAOPERATORIE	36
4. TECNICA CHIRURGICA: LINFOADENECTOMIA.....	44
5. DIAGNOSI: CITOLOGIA VS ISTOLOGIA	47
6. PROBLEMI E LIMITI NELLA PRATICA CLINICA	50
7. CASI CLINICI.....	53
7.1. AMELIE	53
7.2. PUNK	55
7.3. CUKO.....	59
7.4. PLUTO	62
8. CONCLUSIONI.....	65
BIBLIOGRAFIA	69
RINGRAZIAMENTI	75

ABSTRACT

The aim of this thesis is to present the new concept of the sentinel lymph node (SLN), its application in cancer surgery and the techniques used to search for it.

During a neoplastic pathology, the sentinel lymph node is the first lymph node to be reached by any metastatic cell from the primary tumour. However, also due to neoplastic lymph angiogenesis, the SLN does not always correspond to the lymph node that is anatomically closer to it (regional lymph node), as also seen in the clinical cases presented here. This new concept has radically changed the approach of veterinary oncologists and surgeons regarding tumour staging, surgery and above all has changed the prognosis of these animals, since the search for the SLN has allowed a better and earlier recognition of the present metastases and consequently made it possible to remove specific suspicious lymph nodes, in contrast to what was previously carried out.

The best technique to confirm the actual presence of neoplastic infiltration at the lymph node level is to subject the samples taken during the lymphadenectomy to histopathological examination, since palpation alone does not give us much information and cytological examination may give false negatives, especially for certain types of tumours.

Various mapping techniques have been developed to search for the SLN, and in this thesis, both preoperative methods such as indirect radiographic lymphography, CT lymphography, planar lymphoscintigraphy and CEUS (Contrast-Enhanced Ultrasound) lymphography, and intraoperative methods such as searching with the use of a gamma camera or methylene blue and searching with NIR (Near InfraRed) imaging are explored.

An in-depth analysis of the present literature showed that the best techniques for SLN detection were the combination of intraoperative lymphoscintigraphy and methylene blue (SLN detection rate of 91.1% to 100%), and as independent techniques, CEUS lymphography and NIR imaging achieved particularly reliable results (SLN detection rates of > 95%). Nevertheless, it is possible to raise sentinel lymph node detection rates by combining two different techniques, as it was done during the clinical case study presented here where indirect radiographic lymphography and intraoperative use of methylene blue were combined.

Further studies are needed, enrolling more and more patients in order to confirm or modify the data collected so far, although this should go hand in hand with the interest and

willingness of veterinarians, even outside the major diagnostic centers, to implement sentinel lymph node research and make it a routine procedure in veterinary surgical oncology.

RIASSUNTO

Lo scopo di questa tesi è presentare il nuovo concetto di linfonodo sentinella (SLN), la sua applicazione in chirurgia oncologica e le tecniche messe in atto per la sua ricerca.

Nel corso di una patologia neoplastica, il linfonodo sentinella è il primo linfonodo a essere raggiunto dalle eventuali cellule metastatiche derivanti dal tumore primario. Tuttavia, complice anche la linfangiogenesi neoplastica, non sempre il SLN corrisponde al linfonodo più vicino anatomicamente al tumore (linfonodo regionale), come riscontrato anche nei casi clinici qui presentati. Questo nuovo concetto ha cambiato radicalmente l'approccio degli oncologi e dei chirurghi veterinari riguardo la stadiazione tumorale, l'intervento chirurgico e soprattutto ha modificato la prognosi di questi animali dato che la ricerca del linfonodo sentinella ha consentito un riconoscimento migliore e precoce delle metastasi presenti e di conseguenza ha reso possibile la rimozione di specifici linfonodi sospetti al contrario di quanto veniva effettuato in precedenza.

La tecnica migliore per confermare l'effettiva presenza di infiltrazione neoplastica a livello linfonodale è sottoporre i campioni prelevati durante la linfadenectomia a un esame istopatologico, visto che la sola palpazione non fornisce informazioni specifiche e l'esame citologico può dare falsi negativi soprattutto per alcuni tipi di tumore.

Per la ricerca dei SLN sono state sviluppate varie tecniche di mappatura e in questa tesi vengono approfondite sia delle metodiche preoperatorie, come la linfografia radiografica indiretta, la linfografia TC, la linfoscintigrafia planare e la linfografia con CEUS (*Contrast-Enhanced UltraSound*), sia intraoperatorie come la ricerca con l'utilizzo di una gamma camera o il blu di metilene e la ricerca con *l'imaging NIR (Near InfraRed)*.

Da un'analisi approfondita della letteratura presente, le migliori tecniche per la ricerca dei SLN sono risultate essere l'associazione tra linfoscintigrafia intraoperatoria e blu di metilene (tasso di rilevamento dei SLN dal 91,1% al 100%), invece come tecnica indipendente la linfografia CEUS e la ricerca con *imaging NIR* hanno ottenuto degli ottimi risultati (tasso di rilevamento dei SLN > 95%). Nonostante ciò, è possibile alzare le percentuali di rilevamento associando due tecniche diverse, come è stato effettuato durante lo studio dei casi clinici qui presentati dove sono state associate la linfografia radiografica indiretta e l'utilizzo intraoperatorio del blu di metilene.

Per confermare o modificare i dati finora raccolti sono necessari ulteriori studi che possano arruolare un numero sempre maggiore di pazienti, anche se questo dovrebbe andare di pari passo con l'interesse e la volontà dei veterinari, anche fuori dai maggiori centri diagnostici, ad attuare la ricerca dei linfonodi sentinella e a farla diventare una procedura di *routine* in chirurgia oncologica veterinaria.

1. INTRODUZIONE

Con i termini “tumore”, “cancro” o “neoplasia” si fa riferimento a una patologia caratterizzata dalla proliferazione incontrollata di cellule che hanno subito un danno al loro materiale genetico (DNA). Il cancro rappresenta una delle prime cause di mortalità negli animali di affezione, così come nell’uomo (Vascellari e Foiani, 2022; Sarver et al., 2022), infatti secondo l’American Veterinary Medical Association (AVMA), quasi la metà dei cani sopra i 10 anni muore per questo motivo.

Nonostante i dati epidemiologici in oncologia veterinaria scarseggino, si stima che circa 1 cane su 4 sviluppi un tumore nel corso della sua vita, con un’incidenza simile a quella riportata nell’uomo (Vascellari e Foiani, 2022; Sarver et al., 2022).

In Italia, gli studi sull’incidenza dei tumori animali sono ancora pochi e perciò non si riescono ad avere dei dati validi per tutto il territorio nazionale, tuttavia, concentrandoci sulle analisi effettuate in diverse aree geografiche nazionali, possiamo notare che hanno fornito risultati variabili: in Veneto, l’incidenza dei tumori nei cani stimata è in continuo aumento, passando da 199 a 538 nuovi casi per 100.000 cani all’anno (2005-2020) (Vascellari e Foiani, 2022). In Piemonte, l’incidenza annuale stimata delle neoplasie canine è più elevata: 804/100.000 per i tumori maligni e 897/100.000 per quelli benigni (Baioni et al., 2017). Nella specie felina, per la quale è disponibile un numero ancora più limitato di studi epidemiologici, si stima in Veneto un’incidenza annuale di circa 87/100.000 (Vascellari e Foiani, 2022).



Figura 1 - Trend dell’incidenza complessiva stimata per i tumori nel cane e nel gatto raccolti nel RTA (Registro Tumori Animali) delle provincie di Vicenza e Venezia (2005-2020).
Tratto da Vascellari e Foiani, 2022.

Molti studi, inoltre, presentano informazioni epidemiologiche ulteriori per comprendere meglio le possibili cause dell'aumentata incidenza delle malattie neoplastiche negli animali da compagnia, ma anche per aiutare i medici veterinari nella diagnosi sempre più precoce di queste patologie. Lo studio proposto da *Pinello et al. (2022)* presenta dei dati che possono essere utilizzati per ottenere delle diagnosi differenziali più specifiche e individualizzate. Ad esempio, è emerso che razze come i Boxer hanno una tendenza più elevata a sviluppare tumori; quindi, utilizzando un approccio orientato alla razza, dovremmo dare maggiore priorità a una patologia oncologica tra le diagnosi differenziali di quel cane rispetto a quella che daremmo a un cane di un'altra razza. Un altro dato importante da considerare quando si fa una diagnosi, è che nei gatti ci sia un'incidenza maggiore di tumori maligni (78,7%) rispetto ai cani (46,2%); inoltre, le femmine della specie canina presentano un rischio maggiore rispetto ai maschi di sviluppare una patologia neoplastica.

Al giorno d'oggi, è ampiamente riconosciuto che il ruolo degli animali domestici nella società è cambiato notevolmente. I *pets* rappresentano per molte persone una figura centrale e fanno ormai pienamente parte del nucleo familiare. Contemporaneamente, i progressi della medicina umana e veterinaria hanno permesso di raggiungere un livello terapeutico e diagnostico molto più sofisticato e intenso rispetto al passato, allungando l'aspettativa media di vita soprattutto per cani e gatti.

Questi progressi si sono verificati in molte aree della medicina veterinaria, come nelle tecniche di *imaging*, nelle terapie mediche e nelle procedure chirurgiche (ad esempio con la chirurgia mininvasiva e interventistica, il *limb sparing*, la chirurgia a cuore aperto); tra queste si evidenzia il tema principale di questa tesi, ovvero la ricerca dei linfonodi sentinella e la successiva linfadenectomia in chirurgia oncologica (*Withrow, 1998; Culp, 2016*).

La conoscenza dei fattori predisponenti, della patogenesi e del comportamento biologico delle neoplasie, rappresenta la base per lo sviluppo di tecniche diagnostiche e di *management* terapeutico, che negli ultimi hanno portato al miglioramento della qualità della vita dei pazienti canini e felini (*Vascellari e Foiani, 2022*).

In questa prospettiva, l'apparente aumento di incidenza del cancro negli animali e nell'uomo, potrebbe essere dovuto al fatto che entrambe le specie abbiano beneficiato di progressi sociali, medici e tecnologici che hanno consentito loro di vivere oltre l'età prevista dalla natura, in quanto i meccanismi di protezione contro le neoplasie specie-specifici che si sono

evoluti nel corso di milioni di anni, non potrebbero affrontare le vulnerabilità acquisite attraverso il rapido aumento della longevità sperimentato dai cani e dagli esseri umani moderni (*Sarver et al., 2022; Di Virgilio et al., 2021*).

Visto lo stretto rapporto tra esseri umani e cani, molti hanno pensato al ruolo che questi ultimi potrebbero avere come “sentinelle” di problematiche ambientali che potrebbero essere alla base dell’aumento della frequenza di patologie oncologiche in entrambe le specie. Molti tumori canini, infatti, assomigliano a quelli umani per comportamento biologico, caratteristiche patologiche, morbilità proporzionale e fattori di rischio riconosciuti (*Reif, 2011*).

Tuttavia, questo pensiero non è condiviso da tutti gli autori, infatti *Sarver et al. (2022)* spiega che sono state notate differenze sostanziali nell'incidenza di specifici tipi di neoplasie che colpiscono i cani e gli esseri umani. Ciò non toglie che la sensibilità condivisa di cani ed esseri umani ai tumori associati all'età, offre delle opportunità uniche per comprendere le relazioni tra invecchiamento dell'organismo e rischio di sviluppo di una neoplasia.

1.1.PRINCIPI DI CHIRURGIA ONCOLOGICA

L'asportazione chirurgica completa di un tumore localizzato cura più pazienti (uomini e animali) rispetto a qualsiasi altra forma di trattamento. Prima di poter realizzare l'intervento però, i chirurghi devono conoscere a fondo l'anatomia, la fisiologia, le opzioni di resezione e ricostruzione per tutti gli organi, il comportamento previsto del tumore e le varie alternative o tecniche coadiuvanti alla chirurgia (*Withrow, 1998; Culp, 2016*).

Il trattamento delle neoplasie prevede l'utilizzo di molteplici tecniche diagnostiche e terapeutiche per riuscire a ottenere il miglior risultato possibile (*Kudnig e Séguin, 2022*).

Per raggiungere questo obiettivo, la comunicazione con i proprietari rimane di primaria importanza, le finalità terapeutiche della chirurgia (ad esempio, intento curativo, citoriduzione o palliazione) devono essere sottoposti ai proprietari, così come la pianificazione delle procedure necessarie, tra cui gli esami preoperatori, la stadiazione del tumore, le opzioni

chirurgiche, i trattamenti adiuvanti eventualmente necessari, i costi, le cure postoperatorie e la prognosi attesa, compresi i rischi di eventuali complicazioni.

La riuscita del trattamento dipende in larga misura dalla comprensione globale del paziente, del suo stile di vita, dal tipo e dallo stadio della neoplasia, dalle terapie adiuvanti disponibili e dalla prognosi prevista.

L'obiettivo del veterinario è fornire informazioni sufficienti ad aiutare i proprietari a scegliere con cognizione di causa il piano di trattamento migliore per il loro animale, compatibilmente con le loro possibilità di *management* e monetarie (Kudnig e Séguin, 2022).

1.1.1. CONSIDERAZIONI PREOPERATORIE

SEGNALAMENTO

L'età, il sesso e la razza del paziente sono fattori importanti per la determinazione delle raccomandazioni terapeutiche che vanno adattate per ogni caso.

L'età avanzata non è necessariamente un fattore prognostico negativo, ma le comorbidità comuni ai pazienti in età geriatrica, come l'insufficienza renale o alcune patologie epatiche, possono limitare o modificare le raccomandazioni di trattamento; tuttavia, l'età del paziente da sola non deve essere considerata come un fattore negativo.

Alcuni tumori, inoltre, sono più comuni in un particolare sesso o razza e il chirurgo deve sempre tenere presente il ruolo che questi fattori svolgono nella diagnosi e nella prognosi (Kudnig e Séguin, 2022; Pinello et al. nel 2022). Ad esempio, nello studio svolto da Dobson (2013), è emerso che le razze Boxer e bull dog, tra cui Bullmastiff, Boston terrier e Staffordshire Bull terrier, mostrano un rischio maggiore di sviluppare un mastocitoma.

Altre considerazioni importanti da notare sono il peso e le condizioni corporee del paziente. I pazienti obesi o in cattive condizioni nutrizionali potrebbero non essere in grado di reagire adeguatamente ai trattamenti o potrebbero essere più gravemente debilitati da un intervento chirurgico importante.

Ad esempio, un paziente cachettico può avere alterazioni così profonde del metabolismo che il recupero postoperatorio potrebbe esserne compromesso (Kudnig e Séguin, 2022).

STADIAZIONE

La stadiazione e la classificazione dei tumori sono utilizzate per prevedere il comportamento clinico delle neoplasie, stabilire delle terapie appropriate, facilitare lo scambio di informazioni tra medici e per consentire un confronto e una valutazione uniformi dei risultati e della prognosi. Il criterio accettato a livello internazionale per la stadiazione del cancro è la classificazione tramite il sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*), utilizzata principalmente per tumori solidi (Rosen e Saprà, 2023; Telloni, 2017). Il sistema TNM valuta: (1) dimensioni del tumore e crescita locale (T), (2) estensione delle metastasi linfonodali (N) e (3) presenza di metastasi a distanza (M) (Tabella 1). Lo stadio clinico viene stabilito prima dell'inizio della terapia ed è determinato dall'esame fisico, dai risultati di laboratorio e dagli studi di *imaging*. Lo stadio patologico viene determinato dopo aver eseguito un esame istologico del tessuto (Telloni, 2017).

T	Dimensione o estensione del tumore
T1 - T4	Rappresentano categorie di dimensioni specifiche designate per ciascun tipo di tumore
N	Coinvolgimento dei linfonodi
N1 - N3	Descrive le caratteristiche dei linfonodi regionali, come il numero di linfonodi ingranditi, l'adesione dei tessuti e la presenza o l'assenza di neoplasia
M	Metastasi
M0	Indica l'assenza di metastasi a distanza
M1	Indica la presenza di metastasi a distanza

Tabella 1 - Rappresentazione del sistema TNM di classificazione dei tumori in medicina veterinaria. Interpretazione tratta da Rosen & Saprà, 2023.

Come ulteriore metodo di classificazione tumorale negli animali da compagnia è interessante quello proposto da Pinello et al. (2022), i quali sono riusciti ad adattare il sistema di codifica dei tumori nell'uomo fornito dalla classificazione Internazionale delle malattie per l'oncologia (ICD-O) in modo che fosse applicabile anche alle neoplasie canine. Il Vet-ICD-O-canine-1 è compatibile con l'ICD-O-3.2 umano ed è coerente con gli schemi di classificazione attualmente riconosciuti per i tumori canini (Pinello et al., 2022).

Le analisi diagnostiche di stadiazione, così come gli esami collaterali tra cui l'emocromo, il profilo biochimico, le analisi delle urine, le radiografie, l'ecografia e la TC sono componenti essenziali per la valutazione preoperatoria dei pazienti oncologici veterinari.

Per molti pazienti un'accurata stadiazione può smascherare una condizione patologica che potrebbe andare ad alterare il piano terapeutico o potrebbe aiutare il chirurgo a elaborare una prognosi più accurata (*Kudnig e Séguin, 2022*).

TERAPIA MULTIMODALE

I pazienti oncologici veterinari sono sempre più spesso gestiti da team multidisciplinari di specialisti che utilizzano un approccio multimodale. Esistono numerosi studi sull'impatto di questi team in medicina umana e si sta notando che questi pazienti hanno maggiori probabilità di ottenere una stadiazione migliore e di ricevere terapie neoadiuvanti.

Una terapia adiuvante rappresenta un trattamento somministrato insieme a un altro per potenziare l'attività di entrambi. Nel caso della chirurgia oncologica può essere qualsiasi trattamento (solitamente chemioterapia o radioterapia) somministrato prima dell'intervento chirurgico di escissione di una massa tumorale (*Wustefeld-Janssens et al., 2021*).

La medicina veterinaria non ha ancora raggiunto la sua controparte umana sia per il numero che per la qualità degli studi in questo campo; tuttavia, secondo *Wustefeld-Janssens et al. (2021)*, esistono diversi casi in cui i trattamenti neoadiuvanti si possono rivelare vantaggiosi e possono migliorare la sopravvivenza globale e il controllo locale della patologia, inoltre, possono ridurre la morbilità causata dalla chirurgia e le complicanze a lungo termine.

Questi trattamenti possono ridurre la "dose chirurgica" (indica quanto il chirurgo deve essere aggressivo riguardo la scelta dei margini di escissione del tumore) necessaria per ottenere il miglior risultato prognostico possibile (*Kudnig e Séguin, 2022*).

La chemioterapia neoadiuvante è raramente praticata in medicina veterinaria; tuttavia, per alcuni tipi di tumore, può rivelarsi un'aggiunta vantaggiosa alla chirurgia.

Un recente studio, ha dimostrato che un protocollo nel quale veniva combinata la chemioterapia al prednisone in un gruppo di cani con mastocitoma di grado intermedio, ha portato a una riduzione delle dimensioni del tumore.

Questo risultato è molto utile nel caso si debbano trattare tumori molto grandi o con alta percentuale di recidiva in zone dove la sede anatomica preclude un'ampia escissione (solitamente 3 cm laterali e un piano facciale profondo) (*Wustefeld-Janssens et al., 2021*).

Tuttavia, esiste una controversia sul rischio di recidiva in pazienti sottoposti a chemioterapia per ridurre il volume del tumore e quindi nei quali si sono applicati margini chirurgici meno aggressivi (*Kudnig e Séguin, 2022*).

Questo viene riportato anche da altri studi come quello di *Petrucci et al. (2020)*, dove si spiega che l'utilizzo di terapie adiuvanti non consegue sempre a un miglioramento della prognosi se comparato all'utilizzo della sola chirurgia.

Possiamo quindi dedurre che mancano ancora degli studi affidabili sul risultato dell'associazione tra chemioterapia e approccio chirurgico e che sono necessarie ulteriori informazioni per valutare il beneficio di questa terapia nei pazienti oncologici veterinari.

Anche la radioterapia neoadiuvante è stata adottata come metodo di trattamento per ridurre la necessità di un intervento chirurgico radicale.

I vantaggi di questa tecnica includono un piccolo campo di radiazioni, il mantenimento di piani tissutali intatti, una migliore ossigenazione dei tessuti e una riduzione del numero di cellule neoplastiche vitali che possono permanere all'interno di un sieroma o ematoma postoperatorio in seguito a resezione di un tumore con margini microscopicamente incompleti.

Complicazioni come la scarsa guarigione della ferita possono verificarsi più comunemente in siti chirurgici irradiati a causa degli effetti delle radiazioni sui fibroblasti e sui vasi sanguigni (*Séguin et al., 2005; Kudnig e Séguin, 2022*).

In prospettiva, vi sono alcuni interessanti sviluppi nell'oncologia interventistica e nell'immunoterapia che probabilmente avranno un impatto sulla pratica clinica veterinaria nei prossimi 10-15 anni, come il vaccino per il melanoma canino (*Oncept – Merial*, già disponibile), il potenziale di modulazione del sistema immunitario attraverso i modificatori della risposta biologica (ad esempio con l'uso delle citochine), la terapia con immunogeni, i vaccini antitumorali e gli anticorpi monoclonali (*Dobson, 2019*).

Altri protocolli come la chemioterapia intra-arteriosa e la chemio-embolizzazione utilizzano un accesso arterioso (femorale o carotide) per inserire cateteri e fili guida monitorati

fluoroscopicamente fino all'arteria di alimentazione del tumore, in modo da somministrare la chemioterapia e/o gli agenti embolici direttamente al tumore.

Sebbene la chirurgia interventistica sia ancora agli albori in medicina veterinaria, è probabile che con la rapida crescita delle conoscenze, delle competenze e della collaborazione tra diversi specialisti, nel prossimo futuro diventerà la pratica *standard* per il trattamento di molte patologie oncologiche (Dobson, 2019).

APPROCCIO CHIRURGICO

Esistono diversi tipi di tumore per i quali un intervento chirurgico eseguito correttamente da solo è in grado di garantire una sopravvivenza a lungo termine o una completa guarigione, come ad esempio i sarcomi e i mastocitomi di grado 1 o 2, i carcinomi non invasivi tiroidei canini, i carcinomi epatocellulari canini e i timomi felini (Calfée, 2014).

La capacità di ottenere un margine chirurgico pulito dipende principalmente dalla posizione della massa e dall'abilità del chirurgo. Le masse situate alle estremità distali, alla testa e al collo rappresentano una sfida a causa della mancanza di tessuti molli periferici e profondi, il che spesso rende impossibile la chiusura primaria dei siti di escissione.

In questi casi, si preferisce effettuare comunque la chirurgia e gestire la ferita aperta in modo che guarisca per seconda intenzione. Se il caso lo richiede, successivamente sarà possibile eseguire un innesto cutaneo (Calfée, 2014).

Parlando dell'approccio chirurgico in oncologia veterinaria, la chirurgia mini-invasiva (MIS) è stata recentemente accolta dai chirurghi e sta registrando una rapida crescita e frequenza di utilizzo. Nonostante l'uso della MIS (in particolare laparoscopia e toracosopia) nella pratica umana sia già inserito in svariati protocolli chirurgici da decenni, l'accettazione della MIS in medicina veterinaria come *standard* di cura è avvenuta più lentamente. Questo fenomeno ha probabilmente una causa multifattoriale e può essere associato al costo della strumentazione, alle dimensioni dei pazienti e alla curva di apprendimento delle nuove competenze chirurgiche. Al giorno d'oggi l'uso della MIS è consigliato per la potenziale riduzione del dolore, il più rapido ritorno alla funzionalità e la potenziale riduzione dell'infiammazione postoperatoria (Balsa e Culp, 2019).

1.1.2. TRATTAMENTI PALLIATIVI

Lo scopo delle cure palliative in chirurgia oncologica è migliorare o quantomeno mantenere la qualità di vita dei pazienti, alleviando i sintomi senza necessariamente rallentare la progressione del tumore o aumentare la durata della vita del paziente.

In medicina umana, l'obiettivo è aiutare i pazienti terminali a controllare il dolore e gli altri sintomi per migliorarne la qualità di vita; diversamente, in medicina veterinaria, la pratica di porre fine al dolore attraverso l'eutanasia è più diffusa.

Tuttavia, il mantenimento della qualità della vita sta diventando una preoccupazione sempre più crescente anche nella pratica veterinaria, e la chirurgia palliativa oncologica (massimo beneficio utilizzando l'intervento meno invasivo), può spesso allineare i migliori interessi dei pazienti e dei clienti (*Di Virgilio et al., 2021*).

Un altro fattore importante da valutare nei pazienti oncologici è rappresentato dalle sindromi paraneoplastiche, alterazioni sistemiche indotte dai tumori che possono contribuire all'elevata morbilità del cancro, peggiorando le condizioni generali del paziente (*Repetti et al., 2021*).

Per aiutare medici veterinari e proprietari a verificare l'efficacia delle cure palliative fornite è stata sviluppata una scala con l'obiettivo di rendere la valutazione il più oggettiva possibile (*Villalobos, 2011; Downing, 2020*).

Score	Evaluated criteria
0–10	PAIN – Correct pain control and the animal's ability to breathe is the primary concern. Is the animal's pain properly controlled? Can the animal breathe normally? Is the use of oxygen necessary?
0–10	HUNGER – Does the animal feed sufficiently? Is hand assistance necessary for the animal to accept food better? Is the use of a probe indicated?
0–10	HYDRATION – Is the animal hydrated or is there dehydration observed? For patients who do not drink water properly, it is necessary to use subcutaneous fluid therapy on a daily basis.
0–10	HYGIENE – Is the animal capable of fulfilling its physiological needs far from where it is located? Do you keep the cleanliness independent? Does the disease interfere with the patient's hygiene?
0–10	HAPPINESS – Does the animal show enthusiasm and interest? Is the animal attentive and does it relate to the family, toys, etc.? Is it a depressed, lonely, anxious, bored, or fearful animal? Can you move the pet bed close to family activities?
0–10	MOBILITY – Can the animal stand up without assistance? Do you need any human or mechanical help? Does the animal want to go for a walk? Does the patient constantly have seizures or imbalance?
0–10	MORE GOOD DAYS THAN BAD DAYS – When bad days outweigh good days, the quality of life can be greatly compromised.
Total	Greater than or equal to 35 represents an acceptable quality of life.

Figura 2 - Scala per valutare la qualità della vita in pazienti oncologici terminali veterinari. Tratto e modificato da Villalobos, 2011.

TRATTAMENTO CHIRURGICO A FINI PALLIATIVI

L'intervento chirurgico a fini palliativi richiede un'attenta considerazione della morbilità prevista rispetto al guadagno atteso per il paziente e il cliente, quindi si tratta di decidere quando rinunciare e non operare.

Il trattamento, qualsiasi esso sia, non dovrebbe mai creare più danni e sofferenza all'animale di quelli già presenti a causa della patologia (*Withrow, 1998*).

Secondo lo studio condotto da *Di Virgilio et al. (2021)* dove viene valutato il lavoro di 492 diplomati ECVS, la maggior parte degli interventi oncologici eseguiti in medicina veterinaria hanno fini palliativi, questo suggerisce che i veterinari si trovino spesso di fronte a tumori in stadio avanzato.

Una delle tecniche utilizzate in questi casi è la metastasectomia, ovvero l'asportazione delle metastasi. Sebbene l'obiettivo di questa procedura sia curativo, è utilizzata anche con intento palliativo (*Di Virgilio et al., 2021*). Nell'uomo, quest'intervento offre un tasso di sopravvivenza nominale ma costante dal 25% al 30% a 5 anni per pazienti che tradizionalmente avrebbero avuto un tasso di mortalità a 6 mesi del 40-50% e quasi nessuno sarebbe sopravvissuto più di 2 o 3 anni (*Gilson, 1998*).

Tuttavia, in medicina veterinaria, pochi chirurghi eseguono abitualmente metastasectomie e solamente la metà di questi la ritiene una pratica utile. Il motivo principale alla base di questa opinione potrebbe essere legato al fatto che queste procedure sono spesso invasive, rischiose e richiedono lunghi periodi di recupero postoperatorio, di conseguenza si scontrano con il concetto etico di trattamento volto a migliorare la qualità della vita (*Di Virgilio et al., 2021*).

Un'altra tecnica spesso utilizzata in chirurgia oncologica è detta di *debulking* o citoriduttiva, e rappresenta l'asportazione incompleta di un tumore (pianificata o non pianificata). È comunemente eseguita ma raramente indicata, dato che anche rimuovendo il 99,9% di un tumore con diametro di un centimetro, si lasciano in sede circa un milione di cellule tumorali (*Withrow, 1998*). Infatti, è una tecnica che viene spesso utilizzata con fini palliativi e non curativi.

2. I LINFONODI E IL CONCETTO DI LINFONODO SENTINELLA

Come risultato del continuo processo evolutivo in medicina veterinaria, molti autori soprattutto negli ultimi anni, si sono concentrati sull'importanza diagnostica e prognostica dei linfonodi sentinella nei pazienti oncologici e su come la loro evidenziazione ed eventuale asportazione possano migliorare la prospettiva di vita dell'animale.

Finora in medicina veterinaria è stato considerato unicamente il linfonodo regionale come presunto primo organo di drenaggio delle cellule metastatiche dal sito tumorale. Solamente con i recenti studi si è notato che il linfonodo regionale non sempre sia colui che riceve queste cellule, ed è qui che prende importanza il concetto di linfonodo sentinella (*Beer et al., 2018*).

Il sistema linfatico è composto da vasi linfatici e organi linfoidi come il timo, le tonsille, i linfonodi, la milza e il tessuto linfatico diffuso (*Dyce et al., 2016*). Questi organi partecipano all'immunità acquisita e innata, filtrano e drenano il liquido interstiziale e riciclano le cellule al termine del loro ciclo vitale. Il liquido che passa dai capillari terminali ritorna al sistema vascolare attraverso i vasi linfatici superficiali e profondi, che a loro volta drenano nel dotto toracico. Il filtraggio di questo liquido consente l'esposizione delle cellule T e B a un'ampia gamma di antigeni, infatti affinché i linfociti B e T specifici per l'antigene si attivino, devono prima subire l'esposizione agli antigeni con l'aiuto di cellule presentanti l'antigene e cellule dendritiche (*Bujoreanu e Gupta, 2022; Dyce et al., 2016*).

Il timo e il midollo osseo costituiscono gli organi linfoidi primari ed entrambi sono coinvolti nella produzione e selezione clonale precoce dei linfociti. Il midollo osseo è responsabile della produzione e della maturazione dei linfociti B e della produzione di cellule T, successivamente le cellule B si spostano verso gli organi linfoidi secondari alla ricerca di agenti patogeni. Le cellule T invece, viaggiano dal midollo osseo al timo, dove inizia la loro maturazione (*Mulita et al., 2023*).

I linfonodi si trovano lungo le vie linfatiche alla convergenza dei principali vasi sanguigni, anche se la loro distribuzione è soggetta a variazioni in base alla specie ma anche in base all'individuo. Questi, filtrano la linfa in entrata e svolgono un ruolo primario nelle infezioni e nelle neoplasie (*Bujoreanu e Gupta, 2022; Dyce et al., 2016*).

2.1. STRUTTURA

I linfonodi sono organi consistenti, a superficie liscia, reniformi od ovoidali che contengono e filtrano la linfa, un liquido chiaro contenente cellule del sistema immunitario e prodotti di scarto dei tessuti.

Lymph Node Structure

& Location of Immune Cells

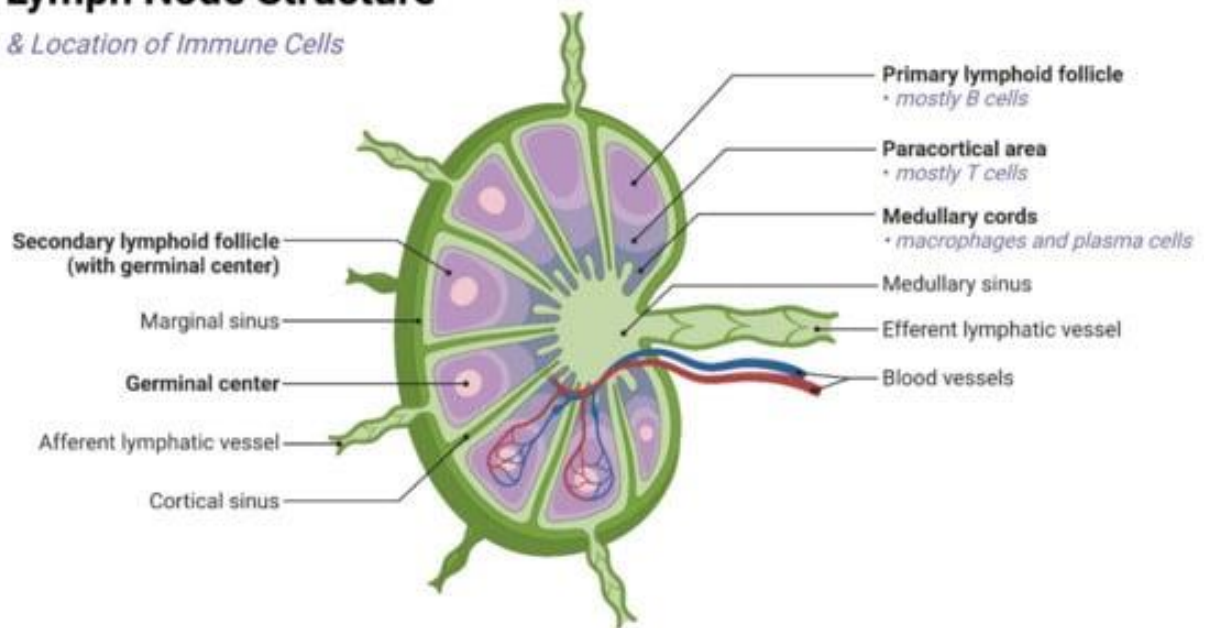


Figura 3 - Schema raffigurante l'anatomia dei linfonodi e la localizzazione dei linfociti. Tratto e modificato da Cheng. et al., 2022.

I linfonodi hanno tipicamente un'arteria e una vena associate e le loro dimensioni sono variabili in base alla specie e alla stazza dell'animale. Sono considerati patologici se perdono la loro forma ovale, se c'è una perdita del grasso ilare, se c'è un ispessimento asimmetrico della corteccia e/o se risultano persistentemente ingranditi (Bujoreanu e Gupta, 2022).

Esternamente presentano una capsula, costituita da uno stroma di tessuto connettivo denso e fibre di collagene; questa invia delle trabecole all'interno del linfonodo, che si irradiano verso il centro.

Al di sotto della capsula si trova il seno sotto-capsulare, uno spazio tra la capsula e la corteccia sottostante. Esso, permette il trasporto del liquido linfatico ed è attraversato da fibre e cellule reticolari, inoltre riceve i vasi afferenti e prosegue con i seni trabecolari unendosi al seno midollare in prossimità dell'ilo, dal quale emergono i vasi linfatici efferenti (Dyce et al., 2016; Bujoreanu e Gupta, 2022).

Il tessuto linfonodale è suddiviso in regione corticale e regione midollare.

La regione corticale contiene i centri germinativi, dove vengono prodotti i linfociti ed è costituita da corteccia esterna e interna, anche detta paracorteccia. Lo strato esterno è formato principalmente da cellule B disposte in follicoli, qui le cellule B immature si sviluppano in un centro germinativo quando vengono esposte a un antigene.

Lo strato paracorticale è costituito da cellule T che interagiscono con le cellule dendritiche.

La regione midollare è lo strato più interno del linfonodo e contiene vasi sanguigni, seni e cordoni midollari lassamente ramificati sostenuti da una trama reticolare contenente plasmacellule, cellule B e macrofagi.

I seni midollari sono spazi simili a vasi che separano le corde midollari, ricevono la linfa dai seni trabecolari e corticali e contengono cellule reticolari e istiociti, inoltre drenano la linfa nei vasi linfatici efferenti (*Dyce et al., 2016; Bujoreanu e Gupta, 2022*).

Tutta la linfa, nel tragitto dai tessuti al sangue, attraversa almeno un linfonodo. Durante il percorso attraverso il parenchima linfonodale, la linfa viene arricchita di linfociti e viene esposta all'attività di cellule che rimuovono e distruggono sostanze particolate e microrganismi presenti.

I linfonodi formano infatti una barriera contro la diffusione di infezioni o tumori, alcuni dei quali prediligono per la loro disseminazione le vie linfatiche alle vie ematiche (*Dyce et al., 2016; Bujoreanu e Gupta, 2022*). Nonostante ciò, il sistema linfatico può anche facilitare la comparsa di metastasi, in quanto il flusso è meno turbolento rispetto al flusso sanguigno e l'elevato contenuto di acido ialuronico può fungere da nutriente per le cellule neoplastiche (*Worley, 2014*).

2.2. LINFONODO REGIONALE VS LINFONODO SENTINELLA

Il linfonodo sentinella è un concetto chiave della chirurgia oncologica odierna. Secondo questo nuovo punto di vista, il processo metastatico avviene in modo ordinato attraverso il sistema linfatico, con le cellule tumorali che drenano in un linfonodo specifico (linfonodo sentinella) all'interno del campo linfatico regionale prima di drenare in altri linfonodi regionali (RLN) o altri organi (Di Virgilio et al., 2021).

Come spiegano Marconato e Foglia (2021), il linfonodo regionale fa parte di un gruppo di linfonodi che drenano l'area anatomica in cui si è sviluppato il tumore. Tuttavia, in presenza di linfangiogenesi neoplastica, non sempre il linfonodo più vicino è il primo a ricevere linfa dalla sede del tumore.

Il linfonodo sentinella rappresenta il primo linfonodo a essere raggiunto dalle eventuali metastasi derivanti dal tumore primario e rappresenta il primo *reservoir* di cellule metastatiche.

Purtroppo come già accennato, non sempre linfonodo regionale e linfonodo sentinella coincidono.

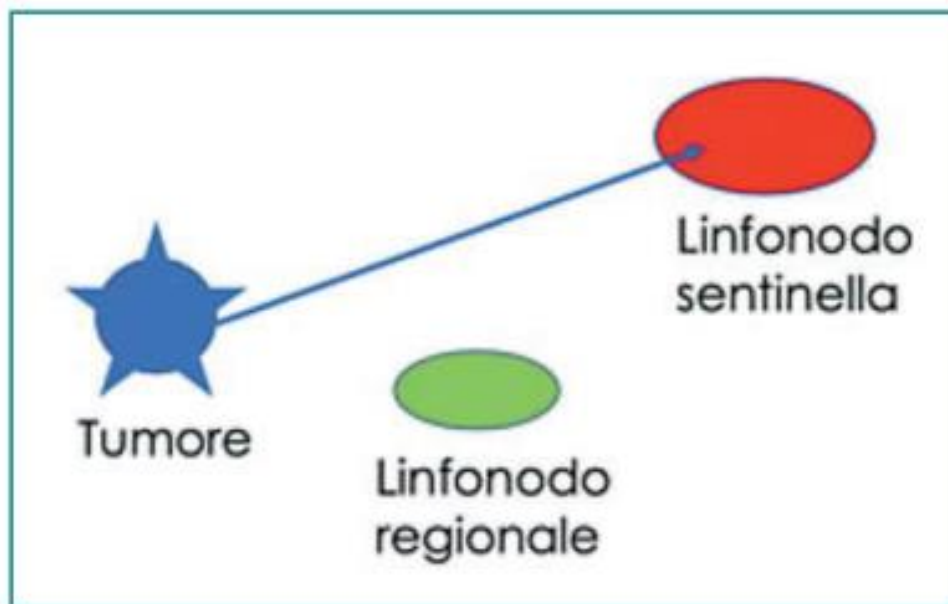


Figura 4 - Drenaggio linfatico del tumore. In blu, il tumore primitivo. In verde, il linfonodo regionale, anatomicamente più vicino al tumore, che non riceve la linfa. In rosso, il linfonodo sentinella, che drena direttamente il tumore. In alcuni casi, linfonodo regionale e linfonodo sentinella coincidono, oppure il linfonodo regionale può ricevere drenaggio linfatico dal linfonodo sentinella, ed essere quindi coinvolto nella diffusione neoplastica in modo secondario. Tratto e modificato da Marconato e Foglia, 2021.

Questo studio spiega bene l'importanza del riconoscimento del linfonodo sentinella, soprattutto per quanto riguarda determinati tipi di tumori solidi che disseminano tramite il sistema linfatico come i carcinomi, mastocitomi, melanomi e, anche se in misura minore, i sarcomi di grado superiore al 3°.

Lo stato dei linfonodi sentinella è un parametro fondamentale con cui gli oncologi prendono decisioni cliniche e definiscono la prognosi (*Marconato e Foglia, 2021*).

Ai fini dell'eventuale linfadenectomia, se il linfonodo sentinella è privo di metastasi, è ragionevole considerare che anche gli altri linfonodi ne siano privi (*Di Virgilio et al., 2021; De Bie et al., 2021*).

Il linfonodo sentinella svolge un ruolo importante come filtro e barriera per la diffusione delle cellule tumorali, pertanto, il suo stato può riflettere quello dell'intero letto linfatico regionale. Nonostante sia ormai riconosciuta l'importanza di questi linfonodi in oncologia umana, finora questo concetto non è stato ampiamente sperimentato in medicina veterinaria (*Di Virgilio et al., 2021*).

Sebbene la presenza di cellule tumorali nei SLN rappresenti un fattore prognostico negativo per molti tipi di tumore, rimane controversa l'asportazione immediata anche del bacino di linfonodi regionali che potrebbero ospitare una malattia occulta e microscopica (*Du Bois et al., 2021*).

Recentemente in ambito umano è stato riconosciuto che il linfonodo sentinella è sottoposto a rimodellamenti che precedono l'effettivo impianto della metastasi.

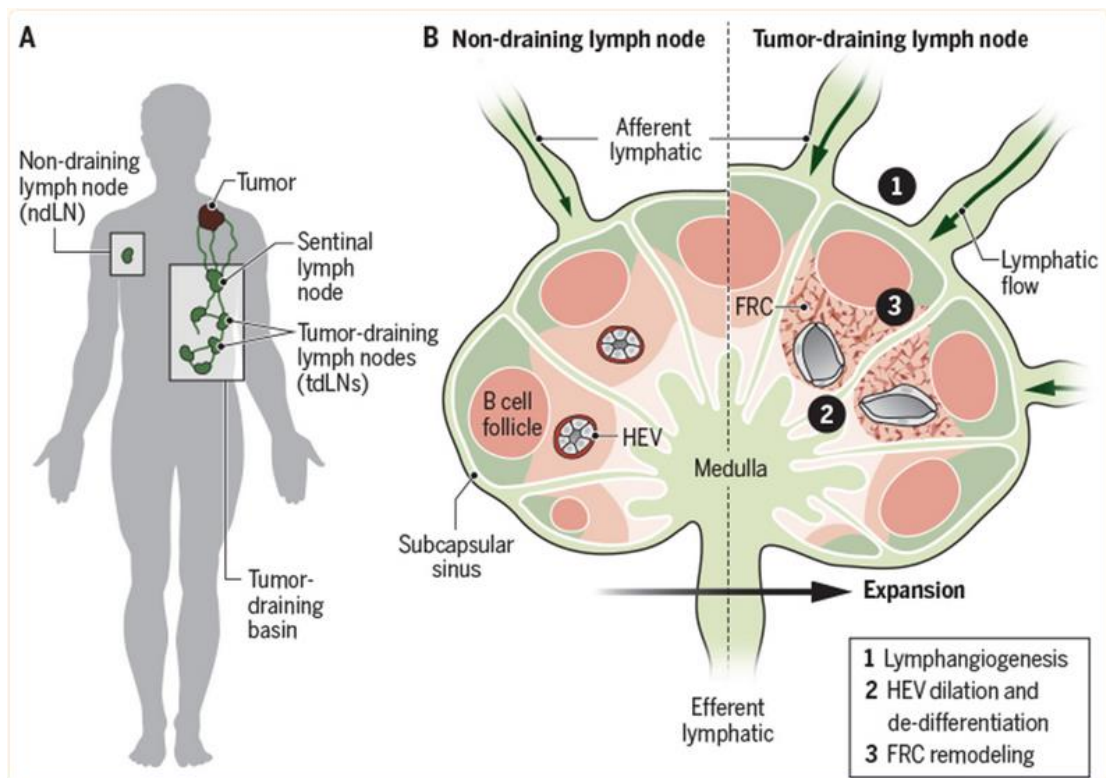


Figura 5 - A. I tumori solidi sono collegati ai linfonodi (LN) attraverso una rete di vasi linfatici. Il LN sentinella è il primo LN che drena la linfa associata al tumore e viene analizzato clinicamente per determinare il potenziale metastatico di una lesione maligna. Questo LN sentinella si trova in un bacino di LN che drenano il tumore (TDLN), che sono a rischio di semina metastatica e sono colpiti in modo unico da un tumore rispetto ai LN distanti che non drenano (NDLN).

B. La linfa afferente scorre dal tumore al TDLN e trasporta materiale di derivazione tumorale, compresi antigeni e vescicole extracellulari. I TDLN si espandono progressivamente e avviano 3 principali processi di rimodellamento stromale che influenzano la struttura del TDLN e il potenziale metastatico: (1) il TDLN subisce un'estesa linfangiogenesi, espandendo i seni linfatici. La linfangiogenesi del TDLN è iniziata prima della semina del tumore e sostiene la progressione metastatica regionale iniziale. (2) Le venule endoteliali alte (HEV) inizialmente aumentano di densità, ma alla fine subiscono una dilatazione e una de-differenziazione, che può compromettere il reclutamento dei linfociti. (3) Le cellule reticolari fibroblastiche (FRC) proliferano nel TDLN, con conseguente allargamento dei dotti, alterazione delle proprietà di esclusione dimensionale dei condotti reticolari e diffusione dell'antigene nella paracorteccia del LN.

Tratto e modificato da Du Bois et al., 2021.

I linfonodi sono collegati ai tessuti periferici non linfoidi attraverso una rete di vasi che trasportano rapidamente segnali derivati dai tessuti per mobilitare risposte immunitarie adattative effettrici in seguito a uno stimolo.

Fornendo un percorso diretto al linfonodo, i vasi linfatici associati al tumore consentono ai tumori primari di fornire segnali che progressivamente rimodellano la funzione del linfonodo a distanza (Figura 5/B).

Poiché i tumori iniziano a sfruttare il trasporto linfatico per le cellule metastatiche già nelle prime fasi del loro sviluppo, l'aberrante ristrutturazione del linfonodo che inducono è in grado di interrompere le normali dinamiche del linfonodo necessarie per guidare le interazioni leucocitarie, consentire l'espansione dei linfociti e guidare la funzione immunitaria protettiva.

Di conseguenza l'espansione linfatica del linfonodo precede la formazione di metastasi e può contribuire a generare un ambiente più permissivo per la crescita tumorale (*Du Bois et al., 2021*).

2.3. PERCHE' RICERCARE IL LINFONODO SENTINELLA?

Se vengono identificate delle cellule tumorali nel linfonodo sentinella, il paziente è a rischio di sviluppare una sindrome metastatica. In tal caso, sono necessarie ulteriori misure diagnostiche e terapeutiche per trattare la patologia e di conseguenza la prognosi del paziente peggiora.

Il SLN può essere localizzato in una posizione anatomicamente imprevedibile e ciò è probabilmente dovuto alla presenza di linfangiogenesi tumorale che va ad alterare la normale via linfatica. Pertanto, è necessario identificare il SLN con una tecnica di mappatura accurata (*De Bie et al., 2021*).

I vantaggi dell'incorporazione della mappatura e della biopsia del SLN sono stati ampiamente riportati in medicina umana e comprendono un'accurata stadiazione del tumore e una ridotta morbilità rispetto alla dissezione linfonodale radicale. Analogamente, nei cani affetti da neoplasia, è stato documentato un beneficio in termini di accuratezza nella stadiazione e la morbilità della procedura risulta apparentemente bassa, sebbene non siano attualmente disponibili nella letteratura veterinaria studi che confrontino la morbilità dell'estirpazione dei RLN rispetto a quella dei SLN (*Chiti et al., 2022*).

L'utilizzo delle tecniche di mappatura del SLN e conseguentemente della linfadenectomia selettiva ha portato molti benefici in medicina umana; tra questi, la riduzione della morbilità, del dolore postoperatorio, del linfedema e dell'intorpidimento iatrogeno.

Grazie alla mappatura dei SLN, vengono rimossi meno linfonodi e quindi l'analisi patologica migliora, in quanto è possibile eseguire indagini intensive su un numero inferiore di campioni. Anche l'assistenza ai pazienti e la loro prognosi è migliorata, in quanto vengono offerte terapie aggiuntive a un numero maggiore di pazienti con metastasi linfonodali identificate rispetto al passato (*Worley, 2014*).

3. METODI DI IDENTIFICAZIONE DEL LINFONODO SENTINELLA

I libri di anatomia descrivono i linfonodi che drenano specifiche regioni anatomiche (Figura 6).

Regione anatomica drenata	Linfonodi	Provenienza dei linfatici afferenti
Testa e collo	Parotidei	Strutture dorsali e laterali della testa, ossa dorsali del cranio, orbita, muscoli masticatori, regione caudodorsale del muso, ghiandola parotide
	Mandibolari	Palpebre, cute del cranio, articolazione temporo-mandibolare, lingua, faringe, pavimento della cavità orale
	Retrofaringei mediali	Lingua, faringe, cavità orale, cavità nasale, ghiandole salivari, orecchio, laringe, esofago
	Cervicali superficiali (prescapolari) Cervicali profondi	Cute della parte caudale del cranio, padiglioni auricolari, arto toracico, tiroide Laringe, tiroide, trachea, esofago, prime vertebre cervicali
Arto toracico	Ascellari e ascellari accessori	Parete toracica, strutture profonde dell'arto toracico, mammelle toraciche e addominale craniale
Torace	Sternali	Coste, sterno, pleure, timo, muscoli regionali, mammelle
	Intercostali	Coste, vertebre, pleure, aorta
	Mediastinici	Muscoli di collo, torace e addome, scapola, ultime sei vertebre cervicali, vertebre toraciche, coste, trachea, esofago, tiroide, timo, mediastino, pleure, cuore, aorta
	Tracheobronchiali (destri, sinistri e medi) Polmonari	Polmoni, trachea, grossi bronchi, aorta toracica, esofago Polmoni
Addome e pelvi	Lombari (sottolombari)	Vertebre lombari, surreni, porzione addominale del sistema urogenitale
	Renali	Sono inclusi nel gruppo dei linfonodi lombari
	Iliaci mediali	Visceri inclusi nel tratto addominale dorsale e pelvi, arto pelvico, sistema genitale, parte caudale del tubo digerente, parte caudale del sistema urinario
	Ipogastrici (iliaci interni) Sacrali Inguinali profondi	Coscia, pelvi, visceri pelvici, coda Visceri e muscolatura adiacente Arto pelvico
Visceri addominali	Epatici	Stomaco, duodeno, pancreas, fegato
	Splenici	Esofago, stomaco, pancreas, milza, fegato, omento, diaframma
	Mesenterici craniali	Digiuno, ileo, pancreas
	Colici	Ileo, cieco, colon
	Gastrici	Esofago, stomaco, fegato, diaframma, mediastino, peritoneo
	Pancreatico-duodenali	Duodeno, pancreas, omento
Arto pelvico	Poplitei	Tratto di arto pelvico distale al linfonodo
	Femorali	Parte mediale di arto pelvico
	Inguinali superficiali	Parte ventrale di addome, organi genitali, mammella addominale caudale ed inguinale, arto pelvico, coda

Figura 6 – Schema dei linfonodi regionali.
Tratto e modificato da Marconato e Foglia, 2021.

I linfonodi periferici esplorabili devono sempre essere valutati durante l'esame obiettivo generale, registrandone la dimensione, la mobilità, la consistenza e la distribuzione delle alterazioni (singolo linfonodo, linfonodi bilaterali o multipli). È noto che la dimensione dei linfonodi non sia sempre correlata alla presenza di metastasi: linfonodi non palpabili o normali

possono comunque essere metastatici e, viceversa, linfonodi aumentati di volume possono essere solamente reattivi a causa di una condizione di iperplasia o di flogosi.

I linfonodi periferici esplorabili includono: i mandibolari, gli zigomatici, i cervicali superficiali (anche detti scapolari), gli ascellari, gli inguinali superficiali e i poplitei. Mediante l'esplorazione rettale è possibile palpare i linfonodi della regione pelvica se alterati (Marconato e Foglia, 2021).

Tradizionalmente, la valutazione dei linfonodi si basava sulla palpazione e sulla citologia mediante ago aspirato dei bacini linfatici superficiali. Tuttavia, la palpazione e le dimensioni dei linfonodi da soli sono fattori predittivi piuttosto scarsi della presenza di metastasi e l'esame citologico può dare un tasso significativo di falsi negativi. L'esame istopatologico dei linfonodi escissi è considerato il metodo più affidabile per identificare le metastasi linfonodali occulte, sia nel cane che nel gatto.

Per diversi anni, le raccomandazioni per la stadiazione linfonodale negli animali da compagnia affetti da neoplasie solide hanno incluso solamente l'asportazione e l'esame istopatologico del linfonodo anatomicamente più vicino, il linfonodo regionale; più recentemente invece, è stata raccomandata l'escissione del linfonodo sentinella (Chiti et al., 2022).

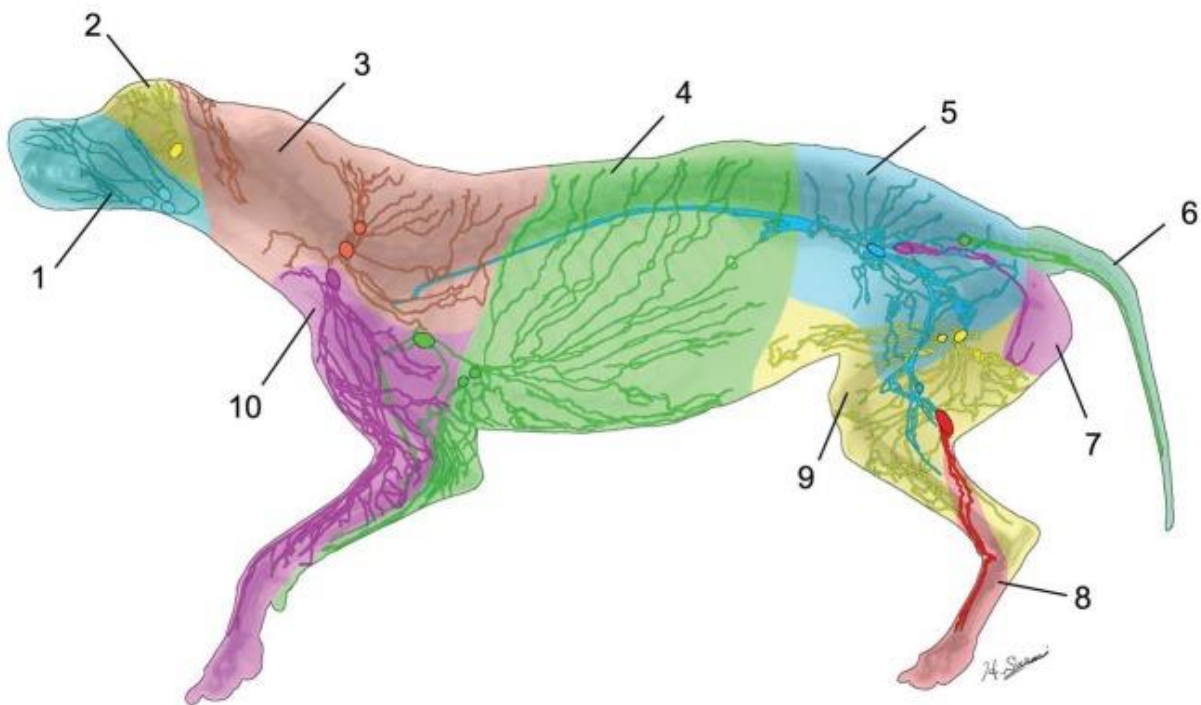


Figura 7 - Principale drenaggio linfatico in base alla regione anatomica.

Nei diversi colori si apprezzano le regioni anatomiche drenate da: 1: linfonodi mandibolari; 2: linfonodi parotidici; 3: linfonodi retrofaringei mediali; 4: linfonodi ascellari; 5: linfonodi iliaci mediali; 6: linfonodi sacrali laterali; 7: linfonodi ipogastrici; 8: linfonodi poplitei; 9: linfonodi inguinali superficiali; 10: linfonodi cervicali superficiali.

Tratto e modificato da Suami et al., 2013.

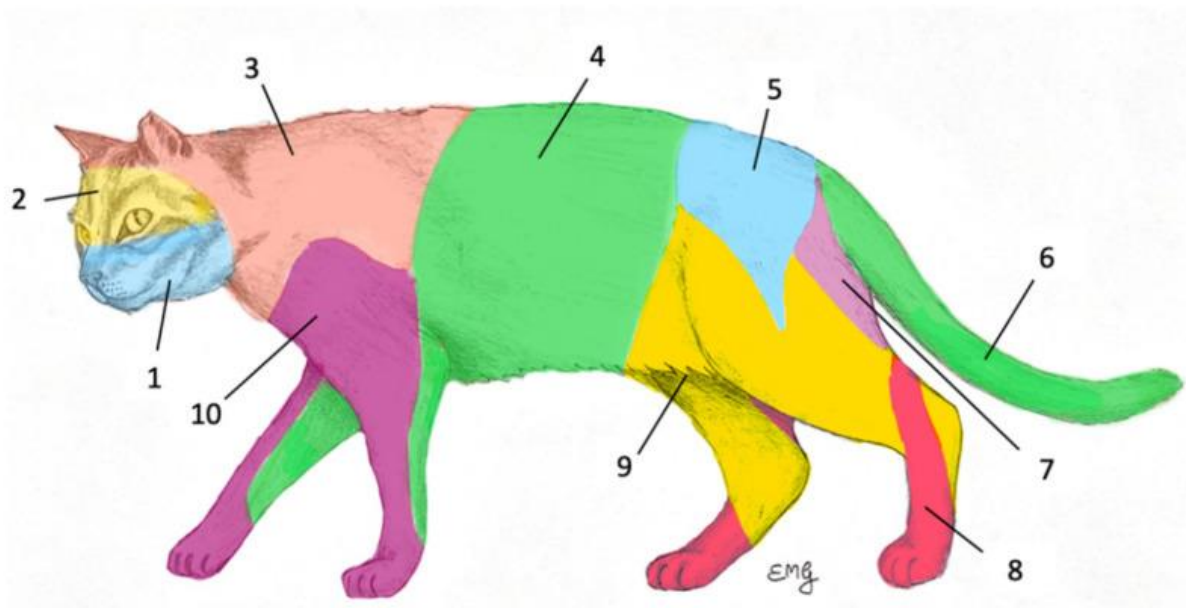


Figura 8 - Riadattamento del concetto di drenaggio linfatico sviluppato da Suami et al. (2013) per il gatto. 1, mandibolare; 2, parotideo; 3, cervicale superficiale dorsale; 4, ascellare; 5, iliaco mediale; 6, sacrale laterale; 7, ipogastrico; 8, popliteo; 9, inguinale superficiale; 10, cervicale superficiale ventrale.
 Tratto e modificato da Chiti et al., 2022.

La mappatura dei linfonodi sentinella è ampiamente utilizzata nei pazienti oncologici umani (Balsa e Culp, 2019), e sebbene siano già disponibili mappe dei modelli di drenaggio locoregionale in pazienti veterinari sani, il modello di drenaggio individuale di un tumore può variare sostanzialmente. A seconda del modello di drenaggio, i linfonodi presenti possono essere suddivisi in primo e secondo livello. Un linfonodo di primo livello drena direttamente dalla zona di un determinato tumore (possono essere più di uno), mentre un linfonodo di secondo livello riceve la linfa dai linfonodi di primo livello.

Nei cani, i linfonodi regionali non corrispondono ai SLN nel 42-63% dei casi e un recente studio nei gatti ha rilevato una discrepanza ancora maggiore (71,4%).

Il campionamento del/dei SLN offre un approccio meno invasivo rispetto alla linfadenectomia regionale radicale, minimizza il tempo di anestesia, riduce il trauma tissutale, la morbilità postoperatoria e migliora l'analisi patologica. Per questi motivi, la mappatura dei SLN è stata adottata con successo in diverse patologie neoplastiche umane e di conseguenza sono state descritte diverse tecniche per la mappatura (Beer et al., 2023; Worley, 2014).

Alcune delle tecniche per l'evidenziazione dei SLN negli esseri umani sono rappresentati dalla linfografia radiografica, dalla linfografia con tomografia computerizzata (TC), dalla linfografia con risonanza magnetica (MR), dall'ecografia con contrasto (CEUS), dalla tomografia computerizzata a emissione di fotoni singoli (SPECT), la tomografia a emissione di positroni (PET), dalla linfoscintigrafia pre- e intraoperatoria e dall'iniezione di coloranti blu per la visualizzazione diretta dei linfonodi o di coloranti fluorescenti per l'*imaging* nel vicino infrarosso (NIR) (Beer et al., 2018).

La tecnica con l'uso della sonda gamma, le tecniche con coloranti blu e la NIR offrono il vantaggio di guidare il chirurgo durante la chirurgia. Nell'uomo la linfoscintigrafia combinata con l'utilizzo del colorante blu si è dimostrata una tecnica molto affidabile e sensibile per il rilevamento dei SLN ed è attualmente considerata il *gold standard* (Beer et al., 2018).

3.1. TECNICHE PREOPERATORIE

3.1.1. LINFOSCINTIGRAFIA

La linfoscintigrafia è una tecnica basata su scansioni a raggi gamma e necessita di un'iniezione di piccole quantità di un tracciante radioattivo solitamente in sede peritumorale (per via intradermica o sottocutanea). Per questo scopo solitamente vengono utilizzati dei colloidi marcati con tecnezio-99m (*Tc-99m*) (De Bie et al., 2021; Beer et al., 2023).

Il tracciante viene assorbito dai vasi linfatici ed emette energia sotto forma di radiazioni gamma (De Bie et al., 2021), inoltre ha la capacità di essere trattenuto nel sito di iniezione per periodi prolungati a causa della sua natura particolata (Beer et al., 2023).

Questa tecnica può essere utilizzata in fase preoperatoria per ottenere maggiori informazioni sul drenaggio linfatico e per individuare il/i SLN, oppure, il chirurgo può utilizzare questa tecnica in sede intraoperatoria, utilizzando una sonda gamma portatile (Capitolo 3.2.3.) (De Bie et al., 2021; Beer et al., 2023).

Nello studio svolto da Manfredi et al. (2021) sono state scattate sia immagini ventrali/dorsali sia immagini statiche laterali (Figura 9), centrate sul sito del tumore.

La linfoscintigrafia in questo caso è riuscita a localizzare il SLN in 57 dei 60 tumori valutati (95%) e questi linfonodi corrispondevano ai RLN in 22 dei 57 casi (38,6%). In otto casi (14%), è stato rilevato un secondo SLN in un territorio linfatico diverso dal linfocentro tumorale.

Nello studio di *Worley* (2012), i SLN sono stati identificati in 18 cani con 19 mastocitomi (MCT) mediante linfoscintigrafia regionale. In otto cani il SLN è risultato diverso dal linfonodo regionale.

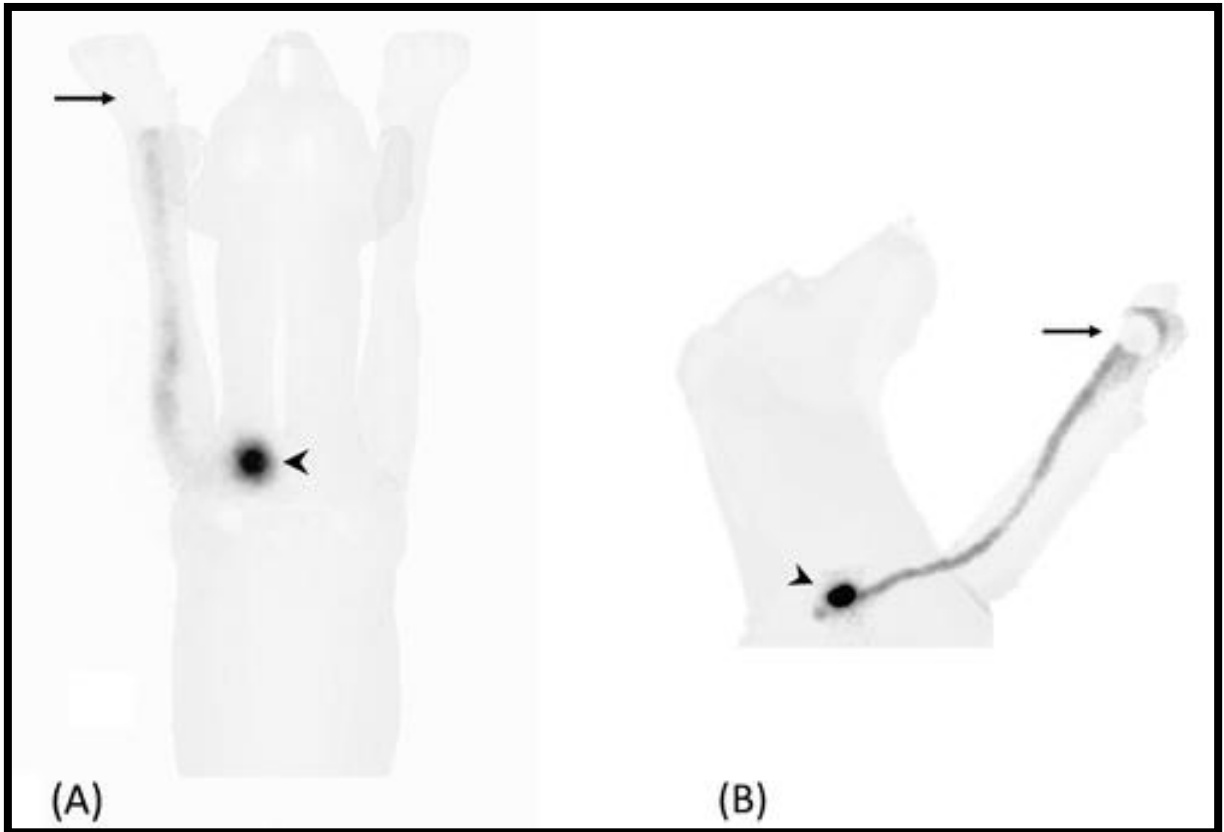


Figura 9 - Immagini statiche planari ventrali (A) e laterali sinistre (B) di un cane con MCT digitale nella mano sinistra. Il sito di iniezione (freccia) è stato mascherato con uno schermo di piombo spesso 2 mm. È visibile una captazione focale del radiofarmaco a livello del LN cervicale superficiale di sinistra (punte di freccia).
Tratto e modificato da *Manfredi et al.*, 2021.

Sebbene la linfoscintigrafia rappresenti il *gold standard* per la mappatura dei SLN, è relativamente poco disponibile in medicina veterinaria a causa dei costi e della difficile gestione del radiotracciante (*Ferraris et al.*, 2023; *Manfredi et al.*, 2021).

Infatti, solamente poche istituzioni dispongono di un reparto di medicina nucleare e del relativo accreditamento per eseguire la linfoscintigrafia, senza contare che la tecnica descritta espone il paziente e il personale chirurgico a radiazioni ionizzanti (*De Bie et al.*, 2021).

3.1.2. LINFOGRAFIA RADIOGRAFICA

La linfografia radiografica può essere eseguita direttamente, iniettando un agente di contrasto nei linfatici, oppure indirettamente.

La linfografia indiretta (IL) è definita come il deposito di un mezzo di contrasto radiopaco alla periferia dei vasi linfatici in sede peritumorale sapendo che questo verrà assorbito e drenato da parte del sistema linfatico consentendo il rilevamento dei SLN (*Brissot e Edery, 2016; De Bie et al., 2021*). L'esecuzione di radiografie seriali entro pochi minuti dall'iniezione consente di delineare i vasi linfatici e i linfonodi drenanti.

Uno dei mezzi di contrasto più utilizzati è rappresentato dal *Lipiodol Ultra-Fluid TM* (*Collivignarelli et al., 2021*). Gli agenti di contrasto possono anche essere iniettati direttamente nel tessuto tumorale, anche se questa pratica non è raccomandata a causa dell'elevato rischio di creare un danno capsulare con successiva semina di cellule tumorali (*Mayer et al., 2012; Beer et al., 2018*).

Pochi studi hanno riportato la IL per la rilevazione di SLN negli animali da compagnia. Il più delle volte è stata applicata in studi sperimentali e clinici per indagare il drenaggio linfatico in animali sani.

Nello studio svolto da *Mayer et al. (2021)*, i SLN sono stati identificati tracciando i vasi linfatici afferenti dal tumore verso un linfonodo con contrasto. Successivamente sono stati confrontati i tassi di rilevamento tra SLN identificati radiograficamente e quelli rilevati on sede intraoperatoria mediante l'uso del blu di metilene. I SLN sono stati identificati con successo in 29 tumori su 30 tramite l'uso della linfografia radiografica (96,6%) e la concordanza tra i SLN colorati e quelli rilevati dalla linfografia è stata osservata nell'84,6% dei casi (*Brissot e Edery, 2016*).

In questo studio sono stati riscontrati effetti collaterali, tra i quali un lieve gonfiore temporaneo e un'inflammatione della zona di iniezione del contrasto.

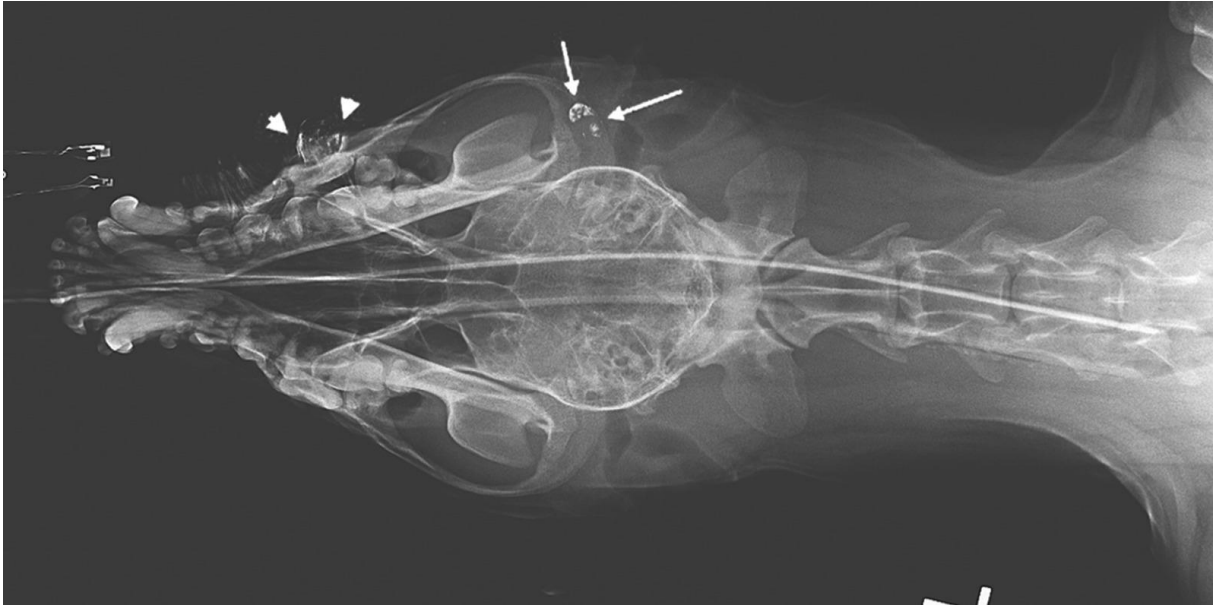


Figura 10 - Springer Spaniel di 12 anni con carcinoma della terza palpebra destra. La radiografia DV della testa è stata eseguita 24 ore dopo l'iniezione sottomucosa di IO. Le punte di freccia mostrano il liquido di contrasto residuo a livello del sito di iniezione mentre le frecce bianche mostrano il linfonodo parotideo.
Tratto e modificato da Brissot e Edery, 2016.

In un ulteriore studio svolto da *Collivignarelli et al. (2021)* è emerso che il modello di drenaggio linfatico della ghiandola mammaria affetta da neoplasia può essere diverso per ogni cane. Questo rafforza l'indicazione che dovrebbe essere valutato ogni soggetto come caso a se stante ogni volta prima dell'intervento chirurgico per comprendere realmente il modello di drenaggio linfatico e anche il SLN specifico per quell'animale. Un'ulteriore dato rilevante emerso da questo studio è rappresentato dal fatto che alcuni SLN sono stati identificati anche 24 ore dopo l'iniezione peritumorale del mezzo di contrasto.

Analogamente, nell'analisi svolta da *De Bonis et al. (2022)* viene riportato l'utilizzo della linfografia radiografica in cani con mastocitoma. Su un totale di 26 MCT (90%), con questa tecnica sono stati identificati correttamente 37 SLN. Dei 26 MCT in cui è stato identificato correttamente il SLN, 17 mostravano un singolo SLN mentre 9 presentavano più di un SLN e solo 10 SLN (27%) corrispondevano ai RLN.

Non sono stati segnalati effetti collaterali immediati o ritardati.

I principali vantaggi della linfografia radiografica sono la grande disponibilità delle apparecchiature e il fatto che sia una procedura non invasiva e semplice, il che la rende fattibile nella pratica clinica (*Beer et al., 2023; Collivignarelli et al., 2021*).

Tuttavia, sono stati riportati tassi di rilevamento più bassi rispetto ad altre tecniche di mappatura dei SLN, oltre a delle discrepanze nei SLN sospetti. Questo rappresenta un limite importante che va preso in considerazione prima di utilizzare questa tecnica come unica metodologia di identificazione dei linfonodi sentinella (*Beer et al., 2023*).

3.1.3. LINFOGRAFIA CON TOMOGRAFIA COMPUTERIZZATA (TC)

La localizzazione dei SLN con la linfografia TC non è una tecnica di prima scelta in medicina umana (*Beer et al., 2018*), nonostante ciò, ci sono molti studi riguardanti questa tecnica in medicina veterinaria e questo potrebbe essere correlato all'elevata presenza nelle cliniche veterinarie di TC e al costo ridotto dello strumento (se comparato alla linfoscintigrafia).

In generale, la linfografia TC può essere uno strumento utile per prevedere la presenza di metastasi linfonodali e vari studi hanno stabilito una relativamente elevata sensibilità e specificità (87,5% e 89,3%, rispettivamente).

A dimostrazione di ciò, con la linfografia TC è possibile distinguere i linfonodi metastatici da quelli non metastatici basandosi sul *pattern* di distribuzione del contrasto; nei SLN privi di metastasi è stata osservata una distribuzione omogenea, mentre è stato notato un *pattern* eterogeneo in corrispondenza dei linfonodi metastatici.

Da un ulteriore studio è stato rilevato che l'utilizzo in associazione di TC e mappatura colorimetrica con blu di metilene ha portato a un tasso di rilevamento del 100%, mentre l'uso della TC da sola ha identificato solamente il 42,1% dei SLN, seguita dal blu di metilene (50,8%). Anche dallo studio eseguito da *Randall et al. (2020)* su 62 mastocitomi la linfografia TC è risultata particolarmente utile nei MCT truncali, per i quali è più difficile stabilire quale sia il RLN, e, in generale, per i MCT localizzati a uguale distanza da diversi linfocentri, dato che in un'alta percentuale (46%) di MCT localizzati in tali aree, il SLN è risultato diverso dal RLN.

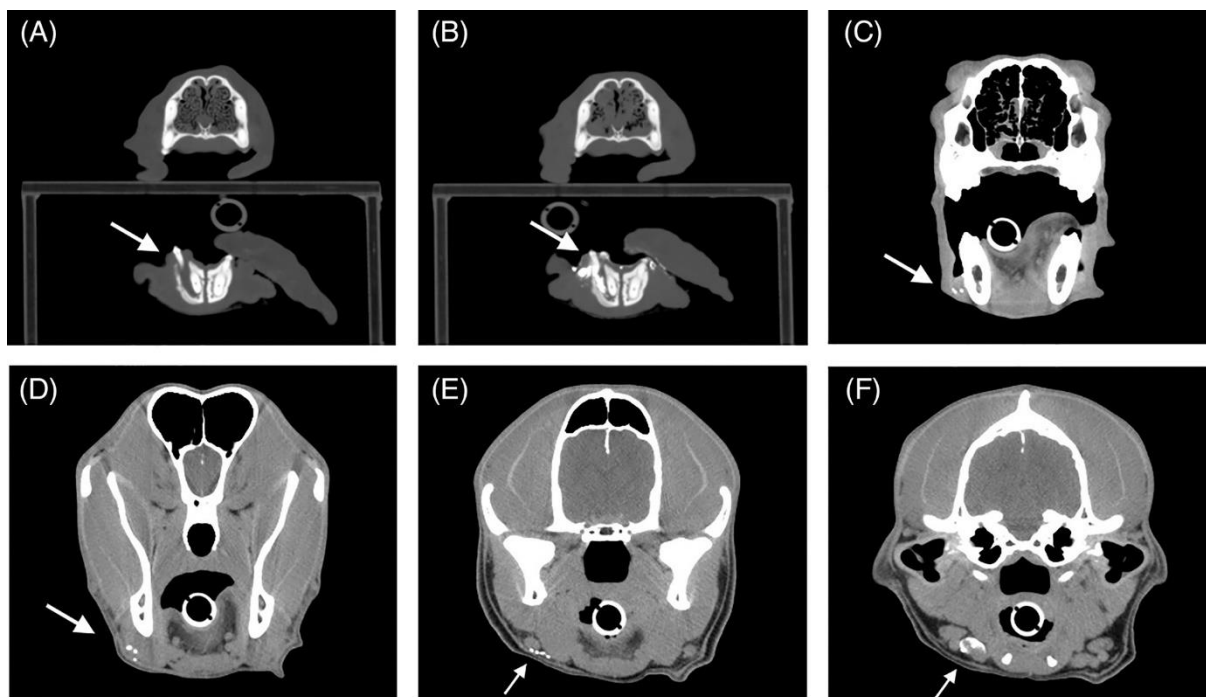


Figura 11 – Immagini di un cane con carcinoma a cellule squamose della mandibola eseguite tramite linfografia indiretta TC. A, Nel sito del carcinoma è presente una piccola massa e c'è lisi della mandibola dx nell'area della radice del canino (freccia). B, immagine nella stessa posizione subito dopo l'iniezione intratumorale di liquido di contrasto iodato. C-E, immagini 1 e 3 minuti dopo l'iniezione, il contrasto è stato identificato nei vasi linfatici adiacenti e caudali alla mandibola (freccie). F, 1 e 3 minuti dopo l'iniezione, il contrasto è stato osservato in 1 dei 2 linfonodi mandibolari dx (freccia). Questi linfonodi sono stati considerati leggermente megalici con un normale aumento del contrasto sulle immagini TC post contrasto. L'istopatologia di entrambi i linfonodi mandibolari dx ha rivelato metastasi con cellule squamose nel seno sottocapsulare.
 Tratto e modificato da Randall et al., 2020.

Nello studio svolto da Rossi et al. (2017) sono stati identificati con successo i linfonodi drenanti in 27 su 45 cani presenti, i quali nel 22,3% non corrispondevano ai linfonodi regionali.

Un altro interessante apporto casistico può essere quello fornito da Majeski et al. (2017), effettuato su 13 cani con adenocarcinoma dei sacchi anali. La linfografia TC ha identificato con successo le vie linfatiche e i SLN in 12/13 casi (92%) ed è stata osservata una variabilità nei SLN e nelle vie linfatiche identificate.

Purtroppo, sono state evidenziati alcuni limiti della tecnica di linfografia con TC, ad esempio nei casi di ostruzione meccanica del tumore o di infiltrazione nei vasi linfatici o nei linfonodi, potrebbe non avvenire la captazione del contrasto. Inoltre, l'iniezione del mezzo di contrasto iodato può provocare effetti collaterali locali come infiammazione, gonfiore e disagio in alcuni cani (Grimes et al., 2017; Rossi et al., 2017).

Un'ulteriore avvertenza è il forte potenziamento dell'agente di contrasto iniettato localmente che in alcuni animali ha causato un artefatto sopra il linfonodo, soprattutto se il tumore

primario e il sito di iniezione si trovavano molto vicini al linfonodo da valutare (*Rossi et al., 2017*).

Inoltre, sono state identificate delle considerazioni tecniche che possono contribuire al successo o al fallimento dello studio di *imaging*, tra cui il posizionamento del paziente, la tempistica dell'*imaging*, il volume totale di mezzo di contrasto iniettato e le dimensioni della massa primaria (*Majeski et al., 2017*)

Il grande vantaggio di questa tecnica è la sua ampia disponibilità nei centri veterinari e può essere una buona tecnica per la ricerca dei SLN (*Grimes et al., 2017*), tuttavia i medici veterinari devono essere consapevoli che il tasso di rilevamento è mediamente basso se utilizzata come unica tecnica (*Beer et al., 2023*).

3.1.4. LINFOGRAFIA CON C.E.U.S.

La CEUS (*Contrast-Enhanced Ultrasound*) è una tecnica molto diffusa in medicina umana e sta diventando sempre più comune anche in medicina veterinaria.

È una tecnica di *imaging* in tempo reale, non invasiva e non ionizzante che sta guadagnando molta attenzione nell'ambito della mappatura dei SLN (*Favril et al., 2019; Fournier et al., 2021*). L'ecografia convenzionale non è in grado di rilevare accuratamente i SLN a causa dell'incapacità di visualizzare i vasi linfatici; con la CEUS, per renderli visibili, vengono utilizzati dei mezzi di contrasto costituiti da microbolle di gas (diametro di 2-10 μm) avvolte da una membrana fosfolipidica e iniettati nel tessuto peritumorale (*Beer et al., 2023; De Bie et al., 2021*).

L'elevata affinità del contrasto lipidico con il sistema linfatico fa sì che questo entri nei vasi in pochi secondi e drena verso i SLN in pochi minuti, a seconda della distanza tra il sito di iniezione e il SLN.

Esaltate dagli ultrasuoni, le microbolle iniziano a oscillare, riflettendo un segnale diverse volte superiore a quello del tessuto corporeo (*Beer et al., 2023*).

È stato suggerito che la presenza di un'ecogenicità uniforme si riferisca a SLN privi di metastasi, al contrario, quando il SLN mostra una captazione di contrasto incompleta, potrebbe essere infiltrato da cellule metastatiche (*De Bie et al., 2021*).

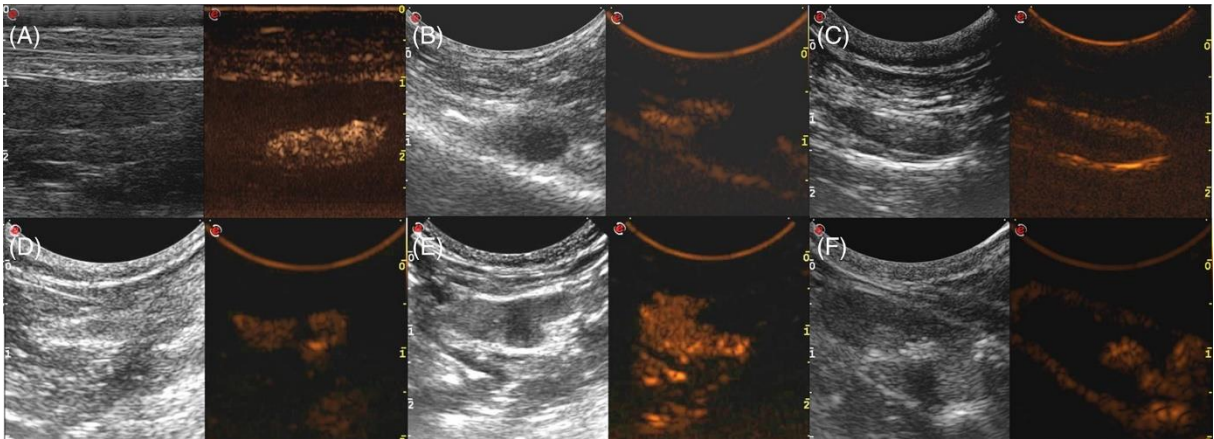


Figura 12 - Modelli di potenziamento del SLN osservati con la CEUS. Sono stati identificati quattro pattern di enhancement principali: Pattern I, SLN completamente e omogeneamente potenziato (A); Pattern II, SLN parzialmente potenziato con architettura disorganizzata (D, E, F); Pattern III, SLN non potenziato con solo tratto/i afferente/i identificato/i (B); Pattern IV, SLN con un sottile e liscio bordo periferico potenziato e centro ipovalorizzato con un'architettura conservata (C).

Il pattern II è stato ulteriormente stratificato in un punteggio di riempimento a 3 livelli: 3, riempimento forte e diffuso del SLN con solo uno o più difetti di riempimento minori (D); 2, riempimento moderato ed evidentemente eterogeneo del SLN (E); 1, riempimento minimo e principalmente periferico del SLN (F).

Per ogni sottofigura, l'immagine B-mode è sul lato sinistro e l'immagine CEUS corrispondente sul lato destro.

Tratto e modificato da Fournier et al., 2021.

Nello studio condotto da Fournier et al. (2021), la tecnica ha ottenuto un tasso di rilevamento dei SLN del 95,2%, che si confronta positivamente con i tassi di rilevamento che vanno dal 60% al 96,6% e dal 91,1% al 100% riportati rispettivamente con l'utilizzo della linfografia TC e con le tecniche di linfoscintigrafia/blu di metilene intraoperatorie.

L'alto tasso di rilevamento e di positività istologica dei SLN associati a questa tecnica ne supportano l'efficacia.

La procedura si è dimostrata essere sicura, pratica e poco costosa, con il vantaggio di avere una visualizzazione trans-cutanea e in tempo reale dei SLN (Favril et al., 2019).

A supporto di questa tesi, in un ampio studio condotto su cani e gatti, è stato riportato che gli effetti collaterali dopo la CEUS sono stati segnalati in meno dell'1% dei casi e comprendono vomito e sincope.

I principali svantaggi della tecnica sono dati dalla variabilità tra gli operatori e dalla difficoltà di identificazione dei SLN a causa di sovrapposizione, ad esempio all'osso, che creano un'interferenza nel segnale ecografico (De Bie et al., 2021).

3.2.TECNICHE INTRAOPERATORIE

3.2.1. MAPPATURA COLORIMETRICA

Il rilevamento dei SLN tramite questa tecnica si ottiene utilizzando dei traccianti linfatici, più comunemente iniettati in sede peritumorale, che andranno a delineare il/i linfonodo/i sentinella. Alcuni dei coloranti utilizzati sono l'*isosulfan blue*, il *blue patent* ma il più comune è il blu di metilene (BM, un colorante a basso peso molecolare) (Beer et al., 2023).

In medicina umana il *gold standard* nella ricerca dei SLN impiega tecniche a doppio tracciante che prevedono una combinazione di radioisotopi, coloranti blu e/o a fluorescenza per aumentarne l'affidabilità.

Tuttavia, il blu di metilene viene spesso utilizzato da solo alla luce della sua economicità, accessibilità e sicurezza (Ram et al., 2021). Infatti il BM viene utilizzato con successo come agente di contrasto per l'identificazione del dotto toracico e per la mappatura dei linfonodi sentinella negli animali da compagnia (Rossanese et al., 2021).

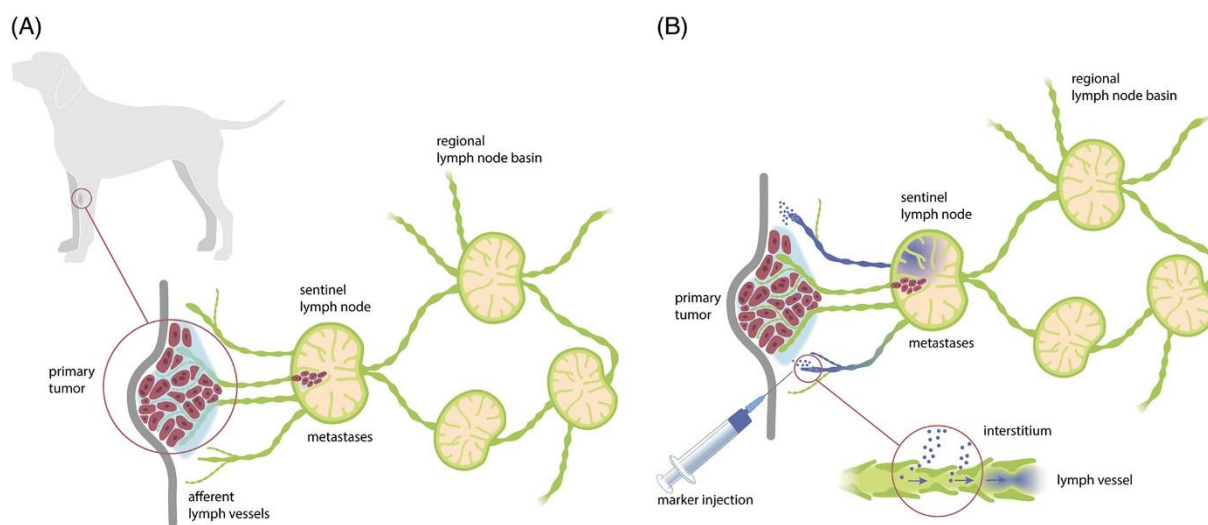


Figura 13 - (A) Illustrazione di un tumore cutaneo sul braccio di un cane e del corrispondente bacino linfonodale. (B) Mappatura del linfonodo sentinella con colorante blu; il colorante viene iniettato in 4 quadranti nel tessuto peritumorale, evitando l'iniezione intratumorale; il colorante viene assorbito dai vasi linfatici afferenti e successivamente drenato nel SLN. Tratto e modificato da Beer et al., 2018.

La mappatura colorimetrica dei SLN può essere utilizzata come aiuto visivo diretto durante l'intervento chirurgico per localizzare i linfonodi interessati in tempo reale. Inoltre, quando i linfonodi colorati sono visibili nel campo chirurgico, è possibile eseguire una resezione più precisa degli stessi, e il tessuto circostante ne risulta meno traumatizzato rispetto alla dissezione alla cieca (De Bie et al., 2021).

Questa tecnica si basa su un'accurata identificazione visiva dei linfonodi ritenuti "sentinella" in base alla captazione del tracciante (Ram et al., 2021), infatti entro 5-15 minuti dall'iniezione peri-tumorale del colorante, i vasi linfatici afferenti e il SLN si colorano. Tuttavia, la visualizzazione diretta è possibile solo in assenza di tessuto sovrapposto alle strutture colorate, il che è tipicamente il caso dei linfonodi, che sono spesso inglobati nel tessuto adiposo (De Bie et al., 2021).

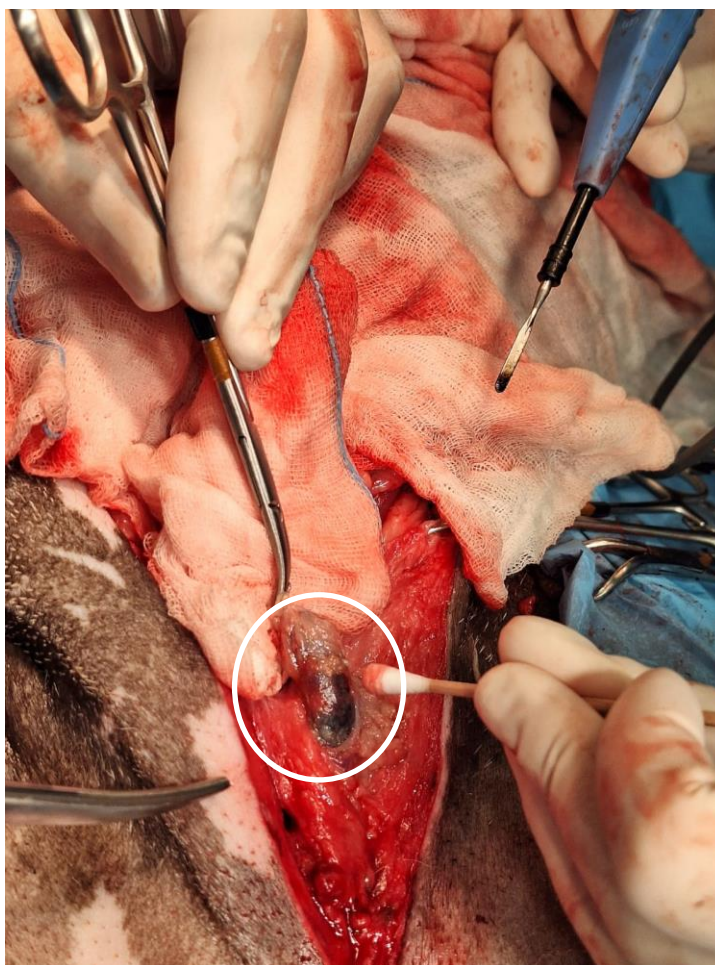


Figura 14 – Immagine intraoperatoria del linfonodo inguinale superficiale sinistro marcato dopo l'iniezione peritumorale di blu di metilene in un Buledogue francese maschio con mastocitoma scrotale. Il cerchio bianco indica il linfonodo.

Nello studio svolto da Manfredi et al. (2021), l'iniezione di blu di metilene è stata utilizzata in 51 casi e ha identificato i linfonodi drenanti in 46 animali (90,2%).

In medicina umana e veterinaria, l'uso del blu di metilene da solo è considerato una tecnica con capacità inferiori nei tassi di identificazione rispetto all'*imaging* con radio-colloidi, all'*imaging* a fluorescenza o a più metodi combinati. Pertanto, è indispensabile che

un'accurata mappatura non si basi solo sull'uso di colorante blu ma sull'utilizzo combinato di metodi di valutazione standardizzati (*Ram et al., 2021*).

I rischi di effetti collaterali, come reazioni tissutali e allergiche in seguito all'iniezione di coloranti, non sono ancora stati segnalati in medicina veterinaria, ma è stata notata la comparsa di anemia a corpi di *Heinz* come evento estremamente raro (*De Bie et al., 2021*).

3.2.2. IMAGING A INFRAROSSI (NIR)

La tecnica NIR per la mappatura dei SLN è un campo in rapido sviluppo nella chirurgia oncologica umana e veterinaria. E' una tecnica non invasiva, non ionizzante e sicura, in grado di fornire informazioni in tempo reale sull'esatta localizzazione dei vasi linfatici afferenti e dei SLN (*Favril et al., 2019*).

I sistemi di *imaging* NIR emettono una luce a una specifica lunghezza d'onda, che viene assorbita dal tracciante fluorescente (precedentemente iniettato), il più utilizzato è l'ICG (verde indocianina) e ritrasmessa a una lunghezza d'onda inferiore; il segnale viene poi tradotto in tempo reale su un schermo a disposizione del chirurgo (*Beer et al., 2023; Favril et al., 2018*).

A differenza della luce visibile, la luce dello spettro del vicino infrarosso è difficilmente assorbita dal tessuto corporeo, il che consente una penetrazione tissutale fino a pochi centimetri, rendendo la NIR adatta all'identificazione transcutanea dei SLN nell'uomo e negli animali.

È stato dimostrato che l'identificazione dei SLN tramite NIR è tecnicamente più semplice, più affidabile e associata a maggiori tassi di rilevamento rispetto ad altre tecniche, il che può essere spiegato dalla minore dimensione delle particelle degli agenti fluorescenti che permette una più rapida diffusione ai linfonodi (*Beer et al., 2023*).

I dispositivi iniziali erano grandi sistemi indipendenti con limitazioni logistiche per l'uso durante la chirurgia. Alcune aziende hanno lanciato sonde portatili, piccole, ergonomiche e leggere, che hanno migliorato notevolmente la praticità d'uso. Oggi si stanno sviluppando anche sistemi adattati a microscopi intraoperatori, laparoscopi e *robot* (*Favril et al., 2018*).

Ultimamente, diverse *metareview* in medicina umana hanno dato conferma di come l'*imaging* NIR con ICG sia una tecnica affidabile anche comparata al *gold standard* della linfoscintigrafia. Infatti, il metodo che ha mostrato il miglior tasso di rilevamento come tecnica indipendente è stato l'*imaging* NIR con ICG, con un tasso di rilevamento del 91% (Beer et al., 2023).

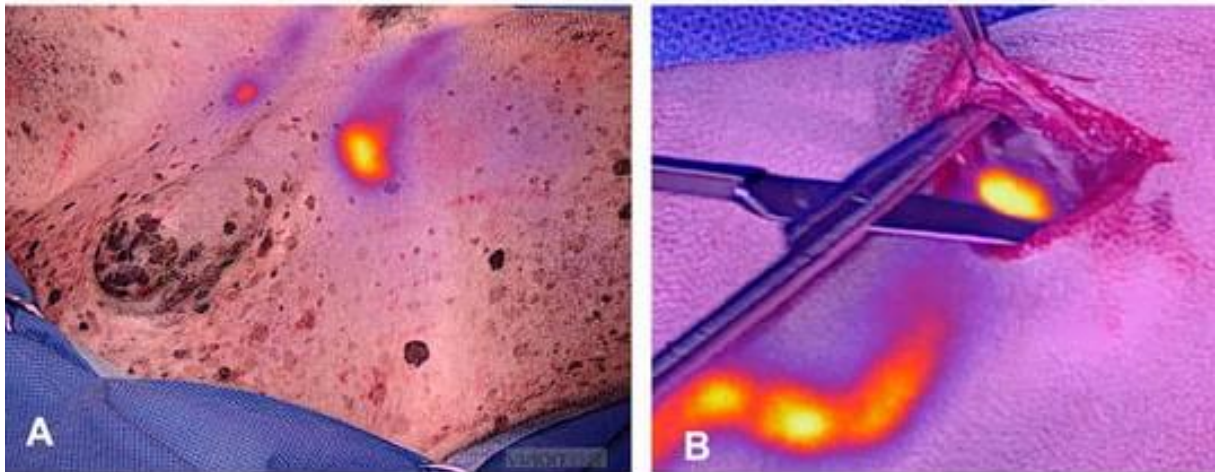


Figura 15 - Linfografia NIR in due cani con mastocitomi cutanei: (A) i due SLN di livello 1 (linfonodi inguinali superficiali bilaterali) diventano visibili dopo l'iniezione peri-tumorale di ICG; (B) grazie al segnale visibile per via transcutanea, è possibile eseguire una linfadenectomia guidata in modo molto più preciso. Il linfonodi si presentavano piccoli (<1 cm) e non palpabili in entrambi i pazienti.

Tratto e modificato da Beer et al., 2023.

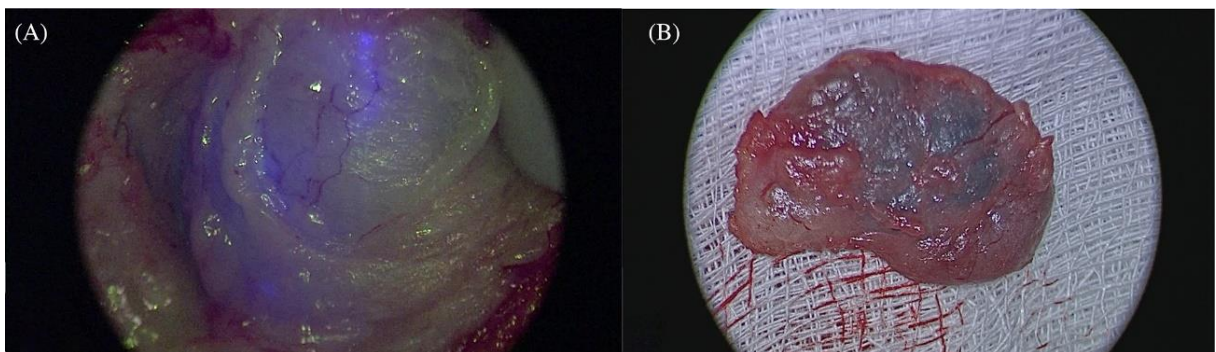


Figura 16 - Immagine intraoperatoria (a sinistra) ed ex vivo (a destra) del linfonodo mandibolare ventro-mediale sinistro nello stesso cane. Possiamo vedere il linfonodo fluorescente all'*imaging* NIR (A) e colorato di blu (B).

Tratto e modificato da Wan et al., 2021.

Nello studio svolto da Beer et al. (2022), più di due terzi (69%) dei pazienti trattati con la tecnica NIR avevano uno o più linfonodi metastatici, invece nei cani trattati con linfadenectomia non guidata, solamente in un terzo (33%) sono state identificate delle metastasi linfonodali.

Nel complesso, l'*imaging* ottico NIR offre diversi vantaggi, infatti consente una visualizzazione transcutanea dei coloranti fluorescenti, rendendo superflua una massiccia dissezione

chirurgica del tessuto sovrastante e permettendo di distinguere tra i linfonodi di primo e secondo livello. In più, la migliore visualizzazione anche di linfonodi piccoli e non palpabili determina un tasso di successo delle linfadenectomie significativamente maggiore rispetto alle linfadenectomie non guidate (*Beer et al., 2023*).

Non sono state segnalate complicazioni legate alla mappatura nel cane o nel gatto. Gli svantaggi della NIR includono la bassa profondità di penetrazione, limitata a pochi millimetri o centimetri, e il fatto che non consente di identificare i linfonodi sentinella nelle cavità corporee senza un accesso chirurgico che permetta l'ispezione visiva (*Favril et al., 2018; Beer et al., 2023*).

Pertanto, ad oggi questo metodo viene utilizzato solamente per la visualizzazione di strutture relativamente superficiali o di tessuti esposti direttamente alla sorgente NIR. Inoltre, manca una standardizzazione nell'uso dei diversi sistemi di *imaging* clinico.

Un ostacolo tecnico è rappresentato dal fatto che la maggior parte dei dispositivi NIR non sono in grado di acquisire e registrare simultaneamente immagini a luce bianca e a fluorescenza. Pertanto, l'illuminazione della sala chirurgica deve essere interrotta in diverse occasioni durante l'intervento (*Favril et al., 2018*).

Sono stati inoltre segnalati dei falsi negativi in linfonodi che presentavano una conformazione alterata, in casi dove la presenza di cellule tumorali bloccavano i vasi linfatici afferenti e in caso di presenza di cicatrici derivanti da precedenti interventi chirurgici (*Beer et al., 2022*).

3.2.3. TECNICA CON SONDA GAMMA (IGP)

Come già brevemente descritto nel Capitolo 3.1.1., la tecnica intraoperatoria con l'utilizzo della sonda gamma rappresenta il *gold standard* (insieme alla linfoscintigrafia planare) per la ricerca dei linfonodi sentinella (*Ferraris et al., 2023; Manfredi et al., 2021*) e permette al chirurgo la visualizzazione durante l'intervento del/dei SLN.

La sonda gamma evidenzia l'accumulo di radioattività, dopo l'iniezione peri-tumorale di un radiotracciante (solitamente viene utilizzato il Tecnezio-99), emesso dal SLN (anche se situato negli strati di tessuto più profondi). Questo metodo risulta molto utile al chirurgo durante l'operazione per distinguere e rimuovere i linfonodi radioattivi che drenano la zona dov'è presente il tumore (*De Bie et al., 2021; Beer et al., 2023*).

Tuttavia, se il SLN si trova in prossimità del tumore, l'elevata radioattività presente nel sito di iniezione può causare delle interferenze con il segnale emesso dal SLN. È anche possibile che il marcatore radioattivo si sposti passando dal SLN verso i linfonodi secondari, che quindi possono emettere un segnale radioattivo più elevato rispetto all'SLN stesso, il che può portare a una diagnosi errata (*De Bie et al., 2021*).

Nello studio svolto da *Manfredi et al. (2021)*, dopo aver eseguito la linfoscintigrafia planare, gli animali sono stati ricoverati per l'escissione del tumore e l'estirpazione dei SLN. Prima della preparazione chirurgica è stato iniettato BM per via peritumorale. I suoni udibili e i conteggi visibili sulla console della sonda gamma, insieme alla visualizzazione del BM, hanno guidato la dissezione chirurgica durante la procedura di linfadenectomia. Ogni linfonodo che presentasse una colorazione blu o una conta radioattiva (RC) doppia rispetto alla RC di una regione corporea distante è stato estirpato.

La sonda gamma ha rilevato in sede intraoperatoria i SLN radioattivi all'interno del bacino linfatico identificato precedentemente dalla linfoscintigrafia in tutti i casi. In due pazienti la sonda ha identificato un ulteriore linfonodo che non era stato riconosciuto con la tecnica preoperatoria (*Manfredi et al., 2021*).

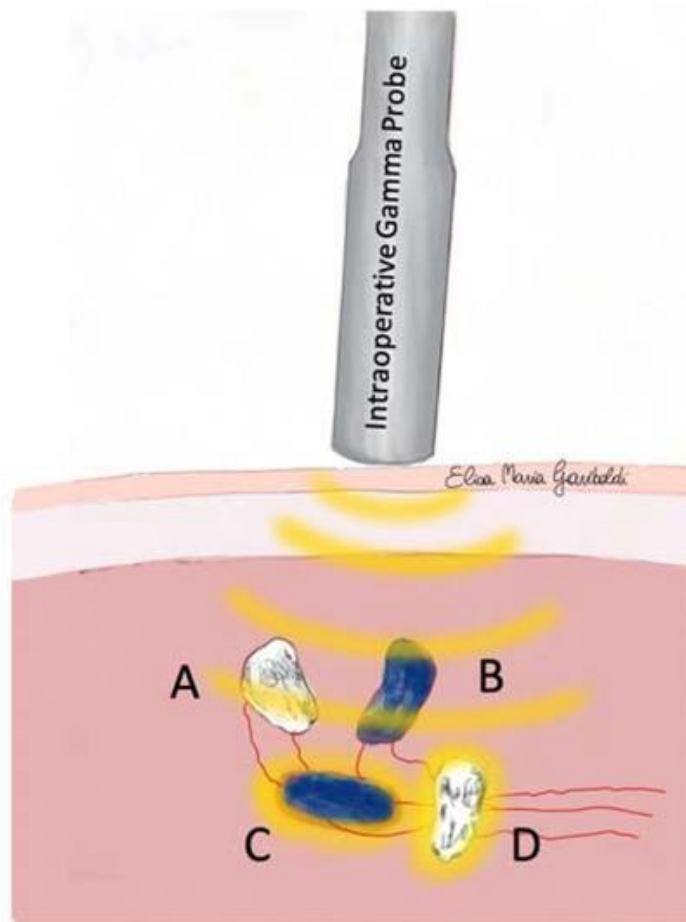


Figura 17 - Scenario intraoperatorio di esplorazione di un SLC (linfocentro sentinella) mediante IGP con almeno un SLN "caldo e blu" (C) o "caldo e non blu" (D) più profondo degli SLN "non caldi" (A e B). Il chirurgo rimuove tutti i linfonodi incontrati durante l'esplorazione del linfocentro sentinella (sia "non caldi" che "blu", o "non caldi" e "non blu") fino a quando l'RC sarà inferiore al 10% dell'SLN più caldo estirpato e nessun altro linfonodo sarà visibile/palpabile. Tratto e modificato da Gariboldi et al., 2023.

Anche Gariboldi et al. (2023) riportano che l'utilizzo dell'IGP è stato estremamente utile per l'individuazione dei SLN all'interno dei linfocentri identificati mediante linfoscintigrafia planare, portando a un tasso di individuazione del 91%. L'assenza di visualizzazione diretta del linfonodo, comunque, non esclude che possano esserci altri SLN reattivi all'interno dello stesso SLC, dato che i linfonodi potrebbero essere di piccole dimensioni o nascosti dal tessuto adiposo, rendendo così difficile per il chirurgo l'identificazione intraoperatoria in assenza dell'IGP.

Alcuni dei SLN che non sono stati rilevati dall'IGP, ma che sono comunque stati rimossi perché vicini a uno o più linfonodi reattivi, sono risultati essere metastatici in stadio precoce; in questi casi, è stato dimostrato che l'asportazione dei SLN ha avuto un elevato impatto terapeutico sui pazienti canini affetti da MCT di basso e alto grado.

Purtroppo, in questo studio, nessuna delle due tecniche per la mappatura utilizzata da sola (mappatura con blu di metilene e IGP), ha portato all'identificazione del 100% dei SLN. Infatti, sarebbe buona norma utilizzare sempre almeno 2 tecniche di mappatura, possibilmente una preoperatoria e una intraoperatoria.

Inoltre in medicina umana, è riportato che dovrebbe essere sempre effettuata la palpazione dei SLC per identificare ulteriori linfonodi "sospetti" e i linfonodi identificati dovrebbero essere sottoposti a biopsia (*Gariboldi et al., 2023*).

4. TECNICA CHIRURGICA: LINFOADENECTOMIA

La linfoadenectomia è l'approccio *standard* attuale applicato ai linfonodi clinicamente sospetti o risultati positivi per malattia metastatica, indipendentemente dal grado istologico del tumore primario (*Sabattini et al., 2021*).

La dissezione linfonodale è una procedura chirurgica nella quale avviene la rimozione di uno o più linfonodi e successivamente da questi viene prelevato un campione di tessuto perché venga sottoposto a un esame istopatologico per verificare la presenza/assenza di cellule neoplastiche.

La linfoadenectomia può interessare uno o più linfonodi presenti nella stessa area anatomica o in aree diverse a seconda delle necessità. Si parla di linfoadenectomia regionale, quando si effettua la rimozione di alcuni linfonodi nell'area del tumore (gruppi di linfonodi inguinali, iliaci, cervicali, poplitei, ecc.) e di linfoadenectomia radicale quando vengono rimossi la maggior parte o tutti i linfonodi nell'area drenante il tumore.

Il ritrovamento di cellule tumorali nei linfonodi è associato a un rischio più elevato della presenza di metastasi in altre parti del corpo e di conseguenza fa presagire una prognosi peggiore (*Mulita et al., 2023*).

Mentre l'identificazione dei linfonodi megalici è in genere semplice, l'identificazione e la rimozione dei linfonodi periferici quando sono di dimensioni normali può essere impegnativo (*Wright e Oblak, 2016*).

Le tecniche di asportazione linfonodale comprendono solitamente la dissezione smussa, la dissezione cruenta oppure l'utilizzo dell'elettrocauterio, con l'obiettivo di rimanere immediatamente al di fuori della capsula linfonodale.

Per eseguire la dissezione smussa di linfonodi molto piccoli o più delicati si possono utilizzare dei bastoncini con l'estremità in cotone sterili, questa tecnica può essere resa ancora più delicata andando a bagnare la punta del *cotton fioc* con soluzione salina sterile.

Si raccomanda di mantenere una presa salda sul linfonodo per evitare di perderne la posizione ma sempre prestando attenzione in modo da non danneggiare la capsula linfonodale. La legatura dei vasi sanguigni del linfonodo, che arrivano attraverso l'ilo, può essere effettuata tramite una sutura monofilamento assorbibile (ad esempio con filo 4-0 o 3-0 PDS) o tramite elettro-cauterizzazione (*Wright e Oblak, 2016*).

Di seguito vengono riportate delle tabelle che elencano i punti di repere anatomico-topografici che possono aiutare nella ricerca chirurgica dei linfonodi.

Lymphocenter	Node(s)	Location	Afferents	Efferents
Mandibular	Mandibular lymph nodes (2–5)	Caudolateral to the angle of the mandible, caudoventral to the masseter muscle, and craniolateral to the basioid	Lips; external nose; cheeks; eyelids; lacrimal gland; superficial muscles of the head; digastricus and myohyoideus muscles; temporomandibular joint; bones of the head; rostral portion of tongue; gums; soft and hard palates; mucous membranes of the ventral portion of the oral cavity	Medial and lateral retropharyngeal lymph nodes
Superficial cervical	Superficial cervical nodes (1–4)	At the cranial border of the supraspinatus muscle, deep to the omotransversarius muscle	Skin and subcutis of the caudal regions of the head and auricle; skin and subcutis of the wall of the thoracic cavity and the thoracic limb; muscles of the neck and shoulder, including the pectorals; flexors and extensors of the digits; bones of the thoracic limb and carpal and digital joints	Efferent lymph vessels enter the jugular vein or join the tracheal trunks and thoracic duct on the left side
Deep cervical	Cranial deep cervical nodes	Craniodorsal and lateral to the thyroid; may be absent	Larynx; trachea; esophagus; thyroid; medial retropharyngeal lymph nodes	Efferents join the tracheal trunks
	Middle deep cervical nodes	Along the middle portion of the trachea; may be absent	Trachea; esophagus; thyroid	Efferents join the tracheal trunks or go to the caudal deep cervical lymph nodes
	Caudal deep cervical nodes	Ventral to the trachea a few centimeters cranial to the first rib; may be absent	Trachea; esophagus; middle deep cervical lymph nodes	Efferents join the tracheal trunks or thoracic duct or empty into the jugular vein
Axillary	Proper axillary lymph nodes (1 or 2)	In the mass of fat on the medial face of teres major, near the first and second ribs	Skin, subcutis, and cutaneous trunci muscle cranial to last rib; skin and subcutis of shoulder and arm; antebrachial fascia; muscles of thoracic limb; all bones of the thoracic limb except the digits; shoulder, cubital, and carpal joints; first three mammary glands; accessory axillary lymph nodes	Efferents terminate in jugular vein or enter the tracheal trunks or thoracic duct
	Accessory axillary lymph node (1)	May be absent; ventral to latissimus dorsi muscle and dorsal to the pectoralis muscle in the second or third intercostal space	Skin and subcutis of lateral and ventral thoracic wall; lateral and medial shoulder and arm, including regions of the olecranon, pectoralis muscle, and first three mammary glands	Proper axillary lymph nodes
Iliosacral	Medial iliac lymph nodes (1–3)	Between the deep circumflex iliac arteries and the external iliac arteries, on the lateral side of the abdominal aorta and the caudal vena cava	Skin, subcutis, and fascia caudal to last rib; skin of pelvic region, including the tail; muscles, tendons, and joints of the pelvic limb; urogenital organs; peritoneum; colon, rectum, and anus; sacral, hypogastric, iliofemoral, femoral, superficial inguinal, popliteal, and caudal mesenteric lymph nodes	Efferents join to form the lumbar trunks, which terminate in the cisterna chyli

Popliteal	Popliteal lymph node (1)	Between the biceps femoris and semitendinosus muscles on the caudal surface of the gastrocnemius muscle	Skin, muscles, tendons, and joints distal to the node; muscles of the leg and thigh	Femoral and iliofemoral lymph nodes if present; if not, efferents drain to the medial iliac lymph node
-----------	--------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------

Figura 18 – Esempi di drenaggio linfatico
 Tratto e modificato da Kudnig e Séquin, 2022.

In generale, non è ancora chiaro se sottoporre l'animale alla rimozione chirurgica preventiva di linfonodi clinicamente non interessati comporti un miglioramento rispetto al rimuovere il solamente il tumore primario e i linfonodi sospetti e invece lasciare in sede i linfonodi non sospetti anche se drenanti l'area anatomica della neoplasia (Sabattini et al., 2021). Anche su questo argomento sono richieste ulteriori indagini per trovare il protocollo migliore per ogni singolo animale trattato.

5. DIAGNOSI: CITOLOGIA VS ISTOLOGIA

La rimozione del linfonodo sentinella sta acquisendo sempre più importanza nella gestione dei vari tumori animali, grazie al suo riconosciuto impatto sulla stadiazione e sulle successive scelte terapeutiche (*Gariboldi et al., 2022*). Infatti, la dissezione linfonodale elettiva con rimozione di più linfocentri è stata raccomandata sia nell'oncologia umana che in quella degli animali da compagnia per ottenere una stadiazione più accurata.

Sebbene questa procedura sembri essere ben tollerata nei cani, con complicazioni minime e morbilità inferiore rispetto all'uomo, essa comporta un'ampia dissezione e la rimozione potenzialmente inutile di linfonodi non drenanti. Pertanto, le tecniche di mappatura linfatica e la biopsia del linfonodo sentinella (SLNB) stanno guadagnando consensi grazie al loro potenziale di rilevare accuratamente la presenza di metastasi linfonodali, limitando al contempo l'estensione della dissezione chirurgica (*Chiti et al., 2021*). Tuttavia, le tecnologie per eseguire la mappatura dei linfonodi sentinella sono disponibili solo in pochi centri e per questo c'è una crescente richiesta di stadiazione linfonodale secondaria successiva all'escissione del tumore (*Gariboldi et al., 2022*).

Per un'accurata stadiazione del tumore, la palpazione e il campionamento del SLN mediante ago aspirato (FNA, *Fine-Needle Aspiration*) o biopsia sono tradizionalmente raccomandati in medicina veterinaria. Infatti, circa nel 60% dei casi è impossibile valutare il linfonodo mediante palpazione o ecografia, di conseguenza la diagnosi di un linfonodo metastatico può essere persa in più dell'85% dei casi se la valutazione viene eseguita solamente utilizzando queste tecniche. La sensibilità e la specificità della palpazione sono state riportate rispettivamente al 60% e al 72%, dei dati molto bassi se confrontati con i risultati della citologia da ago aspirato e dell'istologia, che hanno sensibilità e specificità rispettivamente del 100% e del 96% e del 64% e del 94% (*Beer et al., 2023*).

Pertanto, l'uso di metodologie accurate per il rilevamento dei SLN può fornire informazioni cruciali sullo stadio del tumore, sulla prognosi del paziente e di conseguenza può guidare il veterinario verso la migliore scelta di trattamento (*Beer et al., 2023*).

La citologia mediante la tecnica FNA è un metodo poco invasivo per ottenere un campione di cellule utile a confermare una diagnosi. Le complicanze associate alla FNA sono relativamente rare, il rischio maggiore è dato dal sanguinamento, soprattutto nei pazienti con coagulopatia.

L'altra principale complicazione è la possibile semina dei piani tissutali con cellule neoplastiche mentre si passa l'ago attraverso di essi. Per questo motivo è essenziale valutare se la FNA sia necessaria per guidare il trattamento o se questo possa essere perseguito senza l'utilizzo di questa tecnica (*Sigmon e Fatima, 2022*).

All'interno di un linfonodo, le lesioni metastatiche possono essere focali e quindi possono non essere rilevate dall'esame citologico. Se si sospettano metastasi, ma l'esame citologico risulta negativo, sarebbe opportuno ricorrere all'istopatologia per garantire che il campione citologico sia rappresentativo dell'intero linfonodo (*Wright e Oblak, 2016; De Bie et al., 2021*). Inoltre, i campioni citologici con cellule miste sono spesso difficili da interpretare poiché alcune cellule non esfoliano facilmente e, in alcuni casi, l'iperplasia reattiva può simulare la neoplasia (*Wright e Oblak, 2016*).

La biopsia del linfonodo sentinella è uno strumento di stadiazione ben consolidato in oncologia canina (*Gariboldi et al., 2022*), infatti nonostante la mancanza di standardizzazione nella valutazione dei linfonodi, soprattutto in assenza di patologia linfonodale clinicamente evidente, è ormai assodato che l'individuazione delle metastasi linfonodali debba basarsi sull'esame istopatologico dei linfonodi drenanti asportati (*Chiti et al., 2021*).

Quando possibile, la biopsia linfonodale escissionale seguita da esame istopatologico è considerata il metodo migliore per determinare la presenza di metastasi (*Wright e Oblak, 2016*).

Lo studio effettuato da *Chiti et al. (2023)* dimostra che questa tecnica diagnostica ha portato a un aumento del tasso di rilevamento delle metastasi linfonodali del 42%-60%; inoltre è risultata utile soprattutto nei cani con MCT a causa della discrepanza con il linfonodo regionale e dell'alta percentuale di metastasi occulte (*Chiti et al., 2023; Ferrari et al., 2021*).

Allo stesso modo, le metastasi ai SLN sono state rilevate nel 42% dei cani senza evidenza clinica di metastasi nei linfonodi esaminati.

In generale, la valutazione della morbilità della SLNB è fondamentale per determinare l'effettivo rapporto rischio/beneficio della procedura (*Chiti et al., 2023*).

A supporto di questo argomento, bisogna riconoscere che la biopsia comporta ulteriori procedure anestesilogiche, diagnostiche e chirurgiche oltre che a costi aggiuntivi.

Nello studio svolto da *Ferrari et al. (2021)*, è stata testata statisticamente l'associazione tra le variabili clinico-patologiche del MCT e lo stato del/dei SLN. Sono stati inclusi 50 MCT cutanei di basso grado e 16 MCT sottocutanei ed è stata riscontrata una forte associazione tra dimensione del MCT tegumentario e sottocutaneo con metastasi manifeste al SLN. La dimensione dei MCT cutanei e sottocutanei di basso grado sembra avere una correlazione con lo stato del SLN, ma ulteriori studi dovrebbero confermare questi dati prima di escludere i piccoli MCT dalla biopsia SLN. Al contrario, i risultati dello studio forniscono un solido suggerimento per la mappatura e la biopsia del SLN nei MCT > 3 cm e nei MCT sottocutanei.

In un ulteriore studio, i cani con MCT cutaneo e sottocutaneo sono stati sottoposti a valutazione delle metastasi linfonodali mediante citologia FNA del RLN, seguita da istopatologia del SLN esciso chirurgicamente. Lo stato metastatico istologico del SLN è risultato superiore allo stato metastatico citologico del RLN e di conseguenza ha modificato lo stadio e le raccomandazioni di trattamento aggiuntivo in 7 dei 14 cani presi in considerazione (*Lapsley et al., 2020*).

In conclusione, la decisione finale di eseguire la biopsia del linfonodo sentinella deve tenere conto dell'associazione con la stadiazione linfonodale e del beneficio di tali procedure sull'esito oncologico e sul paziente (*Ferrari et al., 2021*). Ciò nonostante, l'inclusione della SLNB nella gestione dei tumori è auspicabile per una corretta procedura di stadiazione, anche a causa dell'imprevedibilità del drenaggio linfatico in presenza di malattia neoplastica (*Chiti et al., 2021*).

6. PROBLEMI E LIMITI NELLA PRATICA CLINICA

Alcuni dei problemi riscontrati nelle tecniche di mappatura sono già stati descritti nei capitoli 3.1. e 3.2.

COMPLICANZE LEGATE ALLA RICERCA

In medicina veterinaria, al giorno d'oggi, gli studi relativi alla mappatura dei linfonodi sentinella e alla loro conseguente asportazione risultano ancora scarsi sia in numero che per quantità di pazienti arruolati. Se in medicina umana il numero di pazienti studiati parte dalle centinaia, in medicina veterinaria la maggior parte degli studi tra cui quelli visti in questa tesi, utilizzano un numero di pazienti che va dalle poche decine a un massimo di un centinaio circa. Questa notevole differenza di dati raccolti, porta a un risultato meno affidabile degli studi veterinari rispetto a quelli sviluppati in ambito umano.

Con quanto detto precedentemente, non si implica che i dati ottenuti con questa tesi non siano corretti o poco affidabili, tuttavia dal punto di vista puramente statistico è necessario che nel prossimo futuro vengano svolti ulteriori studi riguardanti l'importanza del linfonodo sentinella per confermare o migliorare i risultati qui riportati.

COMPLICANZE POST OPERATORIE

Le potenziali complicanze della linfadenectomia comprendono infezione, deiscenza dell'incisione e sieroma del sito chirurgico.

Inoltre, se non si segue una tecnica di dissezione attenta e ravvicinata ci può essere il rischio di una potenziale lacerazione dei vasi principali, danni ai nervi e alle strutture adiacenti. C'è anche il rischio di rottura o lacerazione del linfonodo con conseguente semina regionale di cellule neoplastiche, e danni alle strutture adiacenti (*Balsa e Culp, 2019; Wright e Oblak, 2016*).

Rimozione accidentale delle ghiandole salivari mandibolari durante la linfadenectomia mandibolare o retrofaringea mediale.

La dissezione linfonodale può provocare un'interruzione del normale schema di drenaggio dei linfonodi che può causare una raccolta anomala di liquido linfatico (linfedema). Si tratta tuttavia di una condizione transitoria (*Wright e Oblak, 2016*).

Nello studio svolto da *Chiti et al.* (2023), le complicazioni postoperatorie della linfadenectomia si sono verificate in 24 cani, con un'incidenza complessiva stimata del 21,2%. Le complicazioni maggiori si sono verificate in 2 cani, con un'incidenza stimata del 2,77% sulla popolazione campione e dell'8,3% sul totale delle complicazioni. In un cane si è verificata la formazione di un grave sieroma nel sito della linfadenectomia e, a causa del mancato miglioramento, è stata eseguita una revisione della ferita chirurgica a 2 settimane con sutura dei piani fasciali profondi; dopo l'intervento è stata raggiunta la guarigione.

Nel secondo cane, i linfonodi cervicali, accessori e ascellari superficiali sono stati rimossi; il cane ha successivamente sviluppato un grave linfedema dell'arto che ostacolava la guarigione del sito tumorale e ha richiesto un massaggio in anestesia generale e un bendaggio compressivo ogni 3 giorni per 2 settimane. Il linfedema si è risolto in 25 giorni.

Complicazioni postoperatorie minori si sono verificate in 22 cani, con un'incidenza stimata del 19,47% sul totale dei cani e del 91,7% sul totale delle complicazioni.

Le complicanze minori sono state linfedema temporaneo, sieroma, ematoma, deiscenza superficiale della ferita (*Chiti et al., 2023*).

Le complicazioni possono essere ridotte al minimo con un'approfondita conoscenza dell'anatomia regionale, rimuovendo solamente i linfonodi interessati e necessari (possibilmente dopo aver eseguito uno studio di ricerca dei SLN) e sezionando con cura e manipolando delicatamente i tessuti per ridurre al minimo lo spazio morto e il trauma tissutale (*Sabattini et al., 2021*).

Se si considera la sede del SLN escisso, l'incidenza più alta di complicanze è stata registrata per i linfonodi cervicali superficiali.

Tra le variabili esaminate, solo l'aumento del peso del cane è stato associato a un aumento dell'incidenza delle complicanze della linfadenectomia (Figura 19) (*Chiti et al., 2023*).

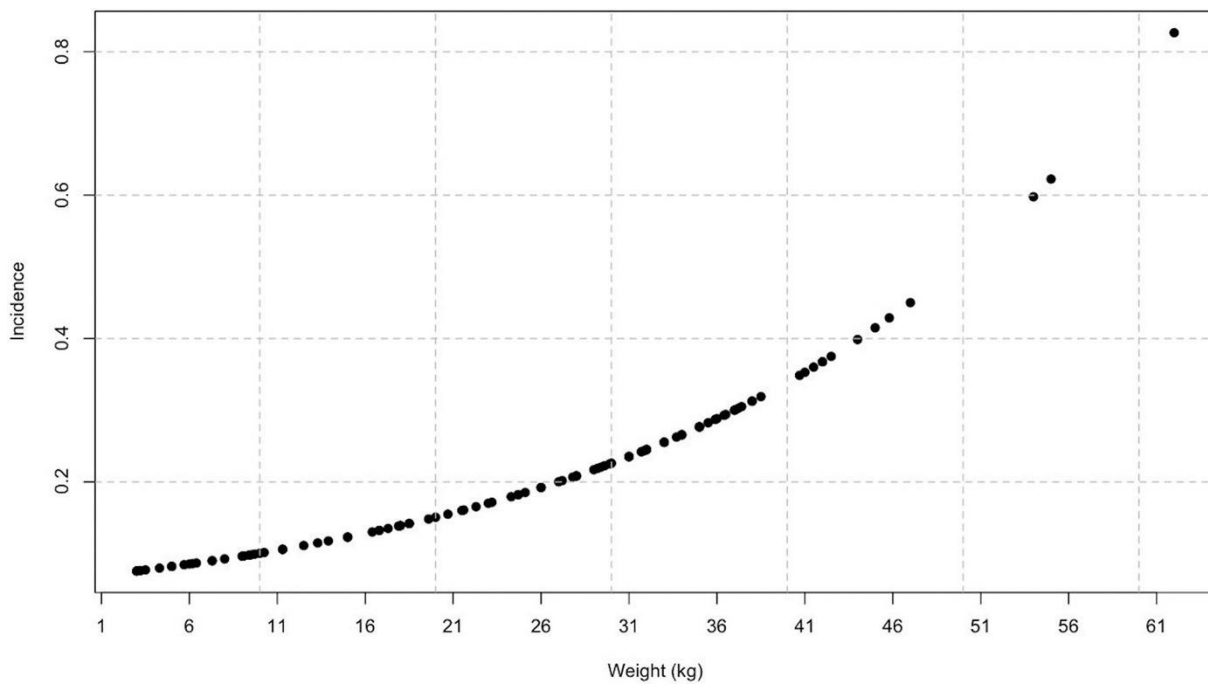


Figura 19 - Incidenza prevista delle complicanze in associazione all'aumento del peso del paziente (aumento di 1 kg). Per un cane di 3 kg, la probabilità stimata di complicazioni della linfadenectomia è pari a 0,08, questa probabilità aumenta a 0,18 per un cane di 25 kg e a 0,83 per un cane di 62 kg. Tratto e modificato da Chiti et al., 2023.

7. CASI CLINICI

7.1. AMELIE

Amelie è un Bouledogue francese femmina (sterilizzata) di 7 anni.

Si presenta in visita presso l'ospedale veterinario universitario didattico dell'Università di Padova (OVUD) per la presenza di una neoformazione interdigitale tra il secondo e il terzo dito che interessava l'arto anteriore sinistro, la massa aveva diametro di circa 1 cm, si presentava arrossata e leggermente ulcerata. I proprietari riportano che la massa è progressivamente aumentata di dimensioni.



Figura 20 – Immagine peri-operatoria raffigurante il mastocitoma cutaneo interdigitale.

Sempre presso l'OVUD è stato effettuato un esame citologico sulla massa che ha dato esito di mastocitoma cutaneo poco differenziato.

In data 27/07/23 il cane torna in visita per effettuare la stadiazione del mastocitoma. All'esame obiettivo l'animale non mostra zoppia nell'arto colpito dalla neoformazione e i linfonodi esplorabili sono nella norma.

Per la stadiazione vengono effettuate delle radiografie toraciche ed esami citologici di fegato e milza che sono risultati tutti negativi per la presenza di metastasi a distanza. In data 07/08/23 viene eseguita la ricerca del linfonodo sentinella tramite linfografia radiografica indiretta combinata all'utilizzo intraoperatorio del blu di metilene (Blu Di Metilene S.A.L.F. 1%)

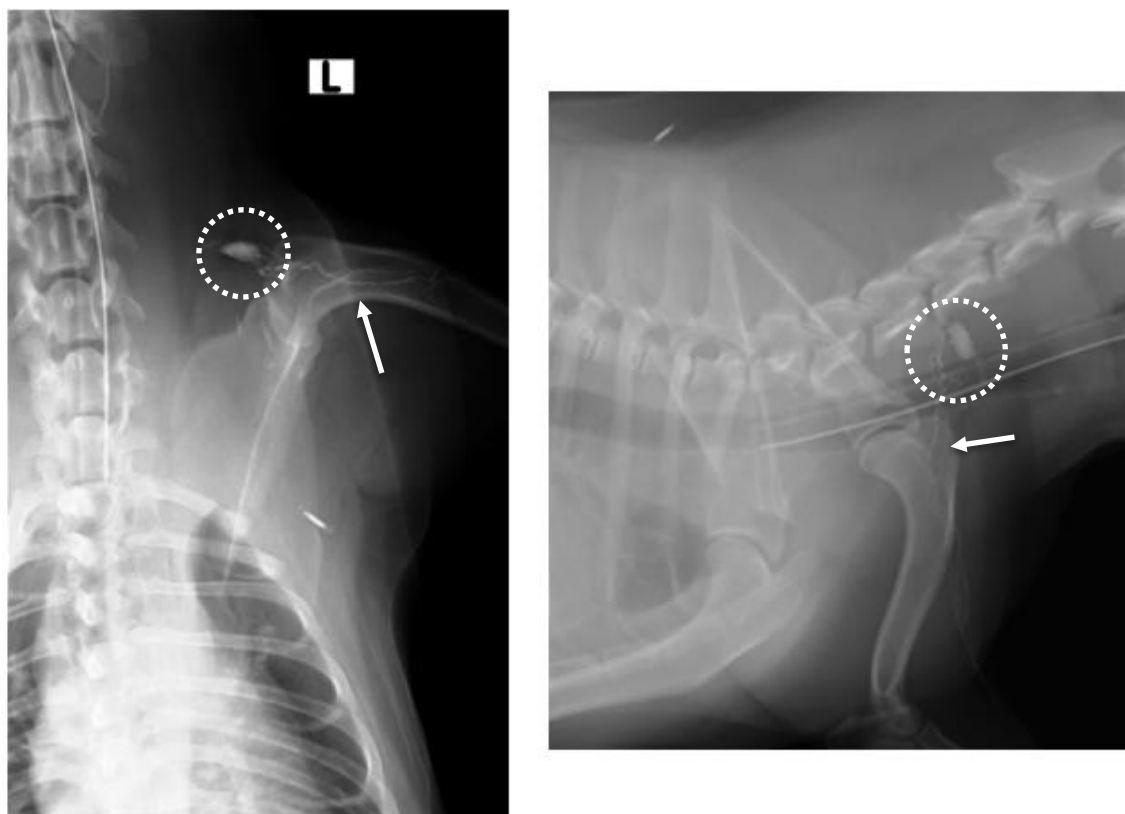


Figura 21 – Immagini radiografiche eseguite in proiezione DV (immagine a sinistra) e in proiezione LL in decubito sinistro (immagine a destra) circa 3-5 minuti dopo l’iniezione peritumorale di un agente di contrasto iodato (Xenetix, iobitridolo 350). Nelle immagini si può vedere come il linfonodo prescapolare sinistro risulti più radiopaco (cerchi bianchi) ed è anche visibile parte del percorso linfatico svolto dal liquido di contrasto in prossimità del linfonodo (freccie bianche).

In chirurgia è stata eseguita l’asportazione del linfonodo prescapolare sinistro (riconosciuto come SLN sia dalla linfografia radiografica, sia dalla mappatura colorimetrica) ed è stata effettuata l’amputazione del terzo dito della mano sinistra. Il chirurgo è stato facilitato nella dissezione del linfonodo sentinella grazie alla colorazione blu assunta da quest’ultimo dopo l’iniezione peritumorale di blu di metilene.

Successivamente sono stati prelevati dei campioni dalla neoplasia primaria e dal linfonodo prescapolare da sottoporre a esame istopatologico; il primo campione ha dato esito di mastocitoma di secondo grado mentre il secondo campione ha dato esito negativo per la presenza di cellule neoplastiche.

In seguito a questi risultati non è stato necessario sottoporre l’animale a ulteriori cure o trattamenti.

Questo caso è interessante perché il linfonodo che è risultato essere drenante l’area anatomica del tumore primario si è dimostrato negativo all’esame istopatologico; questo

potrebbe essere spiegato dal fatto che i piccoli mastocitomi cutanei di basso grado diano meno frequentemente metastasi al SLN rispetto ai mastocitomi cutanei con diametro maggiore ai 3 cm, come riportato da *Ferrari et al. (2021)*.

7.2. PUNK

Punk è un Bouledogue francese maschio (intero) di 6 anni.

L'animale presentava da 3 anni una massa a livello scrotale mai indagata dal veterinario curante, ma recentemente torna in visita in seguito all'aumento di volume del nodulo e alla sua ulcerazione. Quindi il veterinario curante effettua un esame citologico sulla massa scrotale con esito di mastocitoma.

Il cane si presenta in OVUD il 29/08/23 per eseguire ulteriori esami. All'esame obiettivo generale in cane si presenta in buone condizioni, i linfonodi esplorabili sono nella norma e la neoformazione scrotale si presenta arrossata, ulcerata e con un diametro di 3,5cm x 3,5cm.

Successivamente si procede con la stadiazione completa e vengono effettuate delle radiografie toraciche, un'ecografia addominale e vengono campionati fegato, milza e linfonodi regionali per essere sottoposti a esame citologico il quale ha dato esito negativo per il fegato ed esito non diagnostico per la milza.

Dai risultati ottenuti mediante l'ecografia il linfonodi iliaci mediali appaiono megalici.

In data 31/08 si effettua la ricerca del linfonodo sentinella tramite linfografia indiretta seguita dall'operazione di rimozione del tumore primario e dei linfonodi drenanti.

Dalle radiografie effettuate il SLN è risultato essere il linfonodo inguinale superficiale sinistro, ma l'oncologa e il chirurgo hanno comunque scelto di asportare anche entrambi i linfonodi iliaci mediali sulla base dell'esito dell'ecografia addominale.

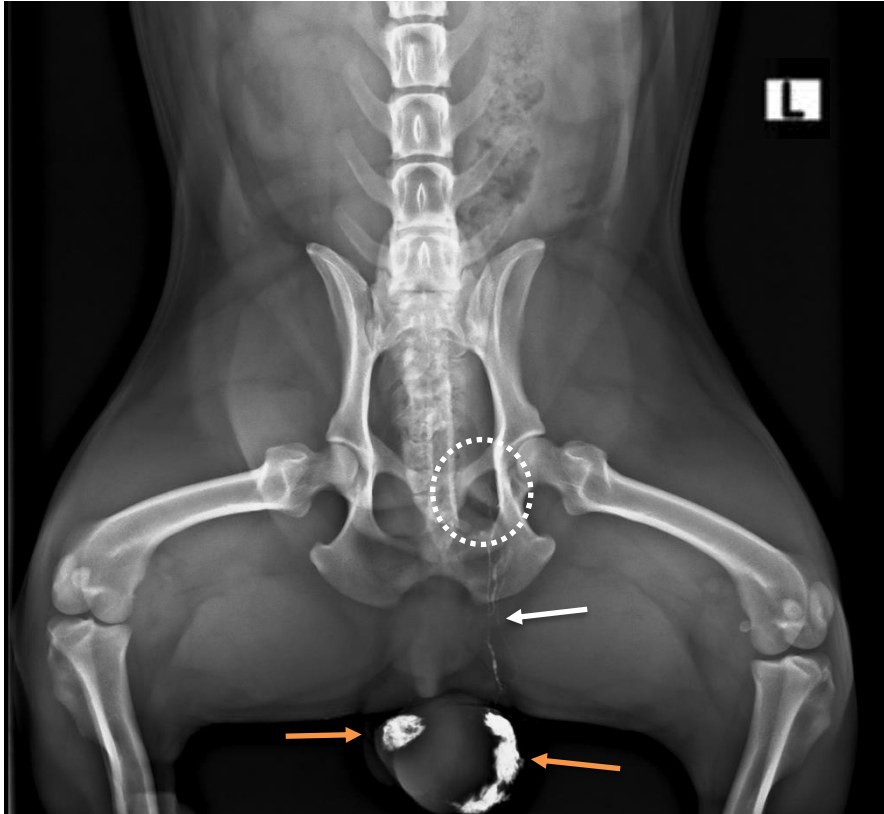


Figura 22 - Immagine radiografica eseguita in proiezione DV circa 5 minuti dopo l'iniezione peritumorale di un agente di contrasto iodato (Xenetix, iobitridolo 350). Nell'immagine si possono notare i punti di iniezione del contrasto a livello scrotale (frece arancioni) e il percorso dei vasi linfatici (freccia bianca) che portano al linfonodo inguinale superficiale sinistro. In questa proiezione il linfonodo superficiale inguinale non è facilmente visibile a causa della sovrapposizione ossea (cerchio bianco).

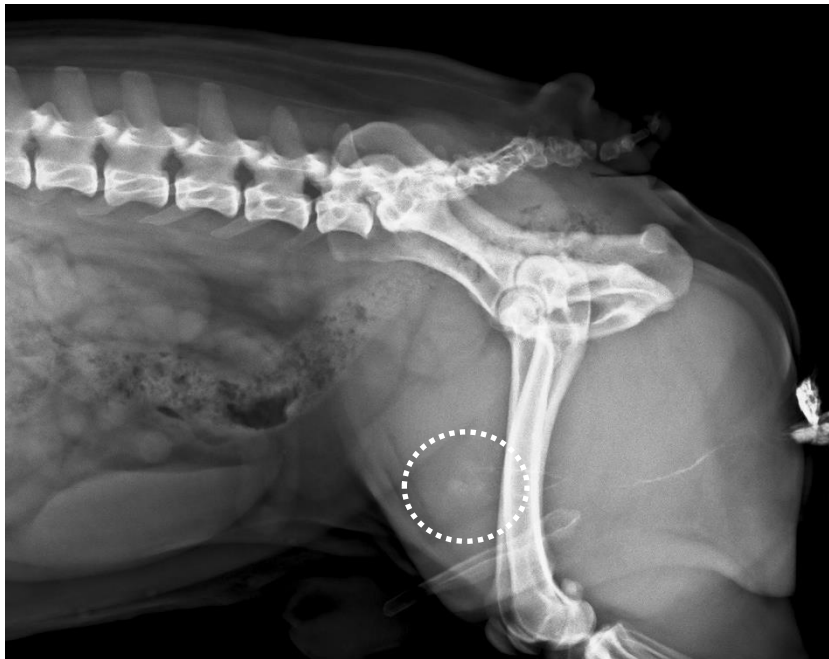


Figura 23 - Immagine radiografica dello stesso animale eseguita in proiezione LL circa 5 minuti dopo l'iniezione peritumorale di un agente di contrasto iodato (Xenetix, iobitridolo 350). In questa proiezione il linfonodo inguinale superficiale è meglio identificabile (cerchio bianco). Inoltre, come nella foto precedente, sono visibili i siti di iniezione dell'agente di contrasto e il percorso dei vasi linfatici afferenti al linfonodo evidenziato.

In fase preoperatoria viene eseguita un'iniezione peri-tumorale di blu di metilene per aiutare il chirurgo a verificare ulteriormente i linfonodi drenanti l'area del tumore e per effettuare la miglior dissezione possibile dei linfonodi, soprattutto vista la rischiosa posizione dei linfonodi iliaci (molto vicini ad arteria e vena iliaca). Tutti i linfonodi scelti per la rimozione sono risultati positivi al blu di metilene durante la chirurgia.



Figura 24 – Immagine intraoperatoria raffigurante la dissezione del linfonodo inguinale superficiale sinistro marcato con blu di metilene (cerchio bianco).

Dopo la rimozione, tutti i campioni sono stati trasferiti al laboratorio per l'esecuzione degli esami istopatologici, da cui è emerso che tutti i linfonodi escissi (linfonodo inguinale superficiale sinistro, iliaco mediale destro e sinistro) presentavano infiltrazione metastatica ed è stata confermata la diagnosi di mastocitoma cutaneo di terzo grado (grado elevato) del tumore primario. Inoltre, è stata rinvenuta la presenza di un leydigoma a livello del testicolo sinistro.

Punk attualmente ha iniziato un protocollo chemioterapico con *Lomustina* 60 mg/m² da ripetere ogni tre settimane.

Un'importante considerazione da fare è il fatto che la linfografia radiografica indiretta non abbia segnalato i linfonodi iliaci anche se questi sono poi risultati metastatici. L'ipotesi è che il SLN fosse il linfonodo inguinale superficiale sinistro e che gli iliaci fossero linfonodi di secondo livello (ricevono linfa dal linfonodo sentinella). Questo sarebbe in linea con l'idea che, se il SLN risulta metastatico, c'è un'alta probabilità che le cellule metastatiche si siano diffuse (Di Virgilio et al., 2021; De Bie et al., 2021).

Questo caso clinico ci fa capire come la linfografia radiografica da sola non sia sempre affidabile se utilizzata come unico metodo per la stadiazione tumorale, dato che, se i medici si fossero affidati solamente a questa tecnica escludendo l'ecografia addominale i linfonodi iliaci non sarebbero stati rimossi, peggiorando l'aspettativa di vita dell'animale.

7.3. CUKO

Cuko è un Bouledogue francese maschio (intero) di 7 anni.

All'inizio del mese di giugno il cane è stato sottoposto a conchectomia totale estesa del padiglione auricolare sinistro a causa della presenza di una neoformazione di circa 5 cm di diametro. Il veterinario curante aveva effettuato un esame citologico sulla massa il cui risultato è stato mastocitoma maligno scarsamente differenziato (referto non presente). Era stato eseguito anche un esame istopatologico sulla massa escissa che ha confermato la diagnosi di mastocitoma di terzo grado con margini puliti.



Figura 25 – Immagine preoperatoria raffigurante la cicatrice chirurgica derivante dalla conchectomia totale estesa.

Il 12/06/23 il cane viene in visita presso l'OVUD a causa di deiscenza della ferita chirurgica con presenza di necrosi. Dopo aver medicato la ferita, rimosso i punti di sutura, somministrato un antibiotico (marbofloxacina, in attesa dell'antibiogramma) ed eseguito 2 colture profonde della lesione da cui è emersa la presenza di *Pseudomonas aeruginosa*, il chirurgo consiglia ai proprietari di Cuko un consulto oncologico e l'attuazione di un protocollo di stadiazione tumorale.

In data 23/06 il cane si presenta in buone condizioni, tuttavia, viene riscontrata una linfoadenomegalia mandibolare sinistra e una neoformazione cutanea sulla spalla destra con

diametro di circa 2 cm, non dolente e non ulcerata. Lo stesso giorno vengono effettuate le radiografie toraciche e gli esami citologici della neof ormazione sulla spalla, del linfonodo mandibolare sinistro, del fegato e della milza. Il linfonodo mandibolare ha dato esito di infiltrazione neoplastica mentre il fegato è risultato negativo, la milza è risultata non diagnostica e la neof ormazione sulla spalla ha dato come esito flogosi mista neutrofilica-macrofagica.

Il 13/07 viene effettuata la ricerca dei linfonodi sentinella tramite linfografia indiretta e rimozione chirurgica degli stessi. In questo caso il mezzo di contrasto è stato iniettato in sede peri-lesionale in quattro punti attorno alla cicatrice chirurgica della conchectomia.

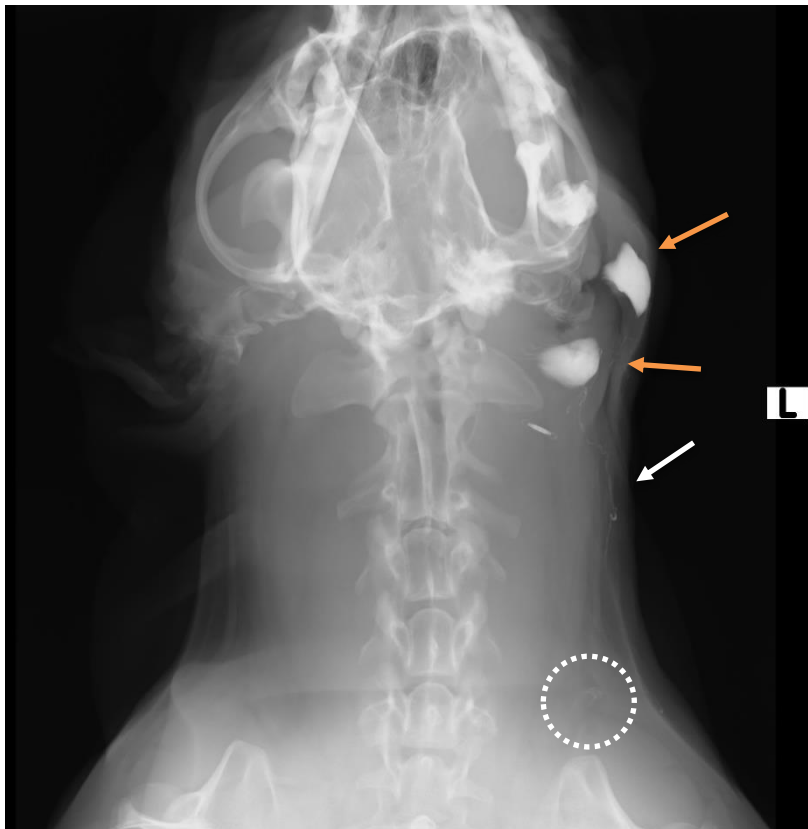


Figura 26 – Immagine radiografica in proiezione DV eseguita circa 3-5 minuti dopo l’iniezione peritumorale di un agente di contrasto iodato (Xenetix, iobitridolo 350). Nell’immagine si possono notare i punti di iniezione del contrasto a livello dell’orecchio sinistro (freccie arancioni) e il percorso dei vasi linfatici (freccia bianca) che portano al linfonodo prescapolare sinistro (cerchio bianco).

Il linfonodo mandibolare sinistro non è ben visibile nella figura 26, probabilmente a causa delle sovrapposizioni tra i siti di iniezione del contrasto e la posizione del linfonodo mandibolare. Un’altra ipotesi potrebbe essere che la linfoangiogenesi tumorale abbia causato un

cambiamento nella normale anatomia locale portando a escludere i linfonodi mandibolari e drenando direttamente verso i linfonodi prescapolari.

I medici veterinari in questo caso hanno deciso di asportare sia i linfonodi mandibolari di sinistra sia i prescapolari di sinistra. I primi in base ai risultati ottenuti dalla visita clinica (infoadenomegalia) e dalla citologia (infiltrazione neoplastica), i prescapolari in base allo studio radiografico dal quale risultavano essere i linfonodi sentinella.

In fase peri-operatoria sono state effettuate delle iniezioni peri-lesionali con blu di metilene per evidenziare i linfonodi drenanti. Sia i linfonodi mandibolari che i prescapolari sono risultati positivi al BM.

Successivamente tutti i linfonodi rimossi sono stati sottoposti a esame istologico per verificare la presenza di cellule tumorali. I linfonodi mandibolari sono risultati non metastatici, mentre i linfonodi prescapolari sono risultati metastatici.

Questo avvalora quanto visto tramite l'uso della linfografia radiografica riguardo i linfonodi drenanti l'area del tumore.

L'animale in seguito alla chirurgia di asportazione linfonodale ha sviluppato un sieroma esteso intorno e sotto al ramo mandibolare sinistro, sono stati effettuati 2 drenaggi e si è risolto nell'arco di circa 3 settimane.

Attualmente Cuko è in cura presso l'OVUD e ha cominciato un trattamento chemioterapico con *Lomustina*.

7.4. PLUTO

Pluto è un Cocker Spaniel maschio (castrato) di 10 anni.

Viene in visita presso l'OVUD il 07/09/23 a causa della presenza di una massa a livello del piede sinistro. In sede vengono effettuati degli esami citologici della massa e del linfonodo popliteo da cui è stata diagnosticata la presenza di melanoma cutaneo con interessamento linfonodale. Successivamente, viene programmato uno studio tomografico *total body* con contrasto (*Optiray 350*, 660 mgI/kg p.v.) per effettuare la stadiazione del tumore; dall'esame si riscontra una marcata megalia del linfonodo popliteo sinistro (7 x 9 mm) che presenta *pattern* disomogeneo di *enhancement* post contrasto e la presenza di una massa (18 x 10 x 18 mm) a carico del versante mediale del secondo dito del piede sinistro con attenuazione omogenea e omogeneo *enhancement* post contrasto.

Il 27/09 viene eseguita la ricerca del SLN tramite linfografia radiografica indiretta e successiva chirurgia per l'escissione del tumore primario ed eventuali linfonodi sospetti. Il mezzo di contrasto è stato iniettato per via peri-tumorale.

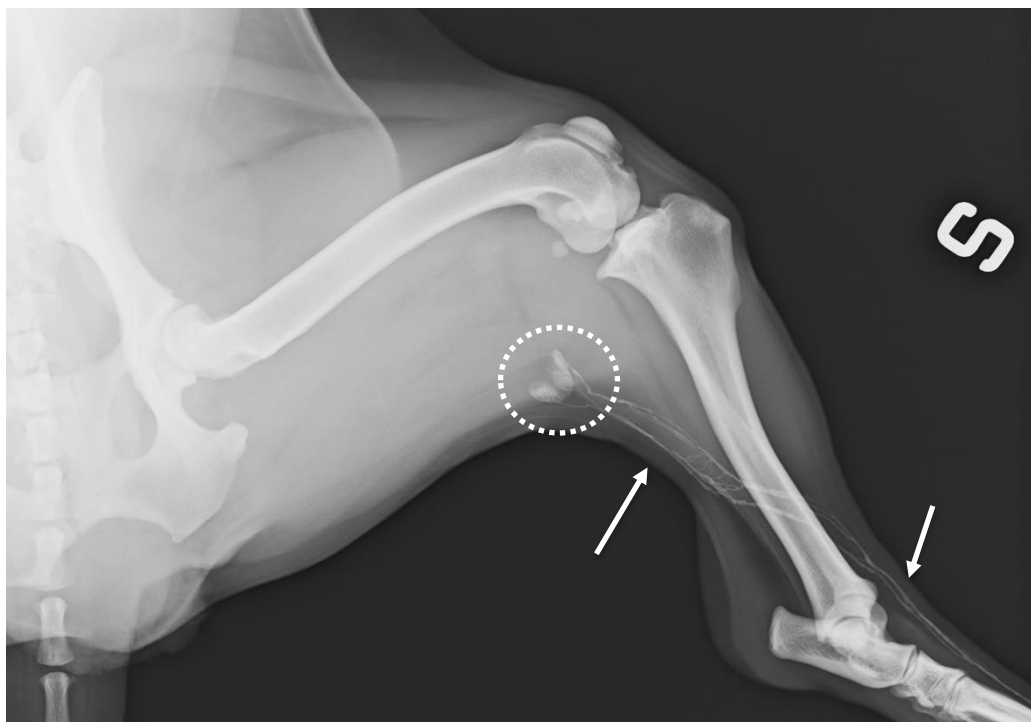


Figura 27 – Immagine radiografica in proiezione DV eseguita circa 3-5 minuti dopo l'iniezione peritumorale di un agente di contrasto iodato (*Xenetix, iobitridolo 350*). Nell'immagine si può notare il percorso dei vasi linfatici (frecce bianche) che dal tumore portano al linfonodo popliteo (cerchio bianco).

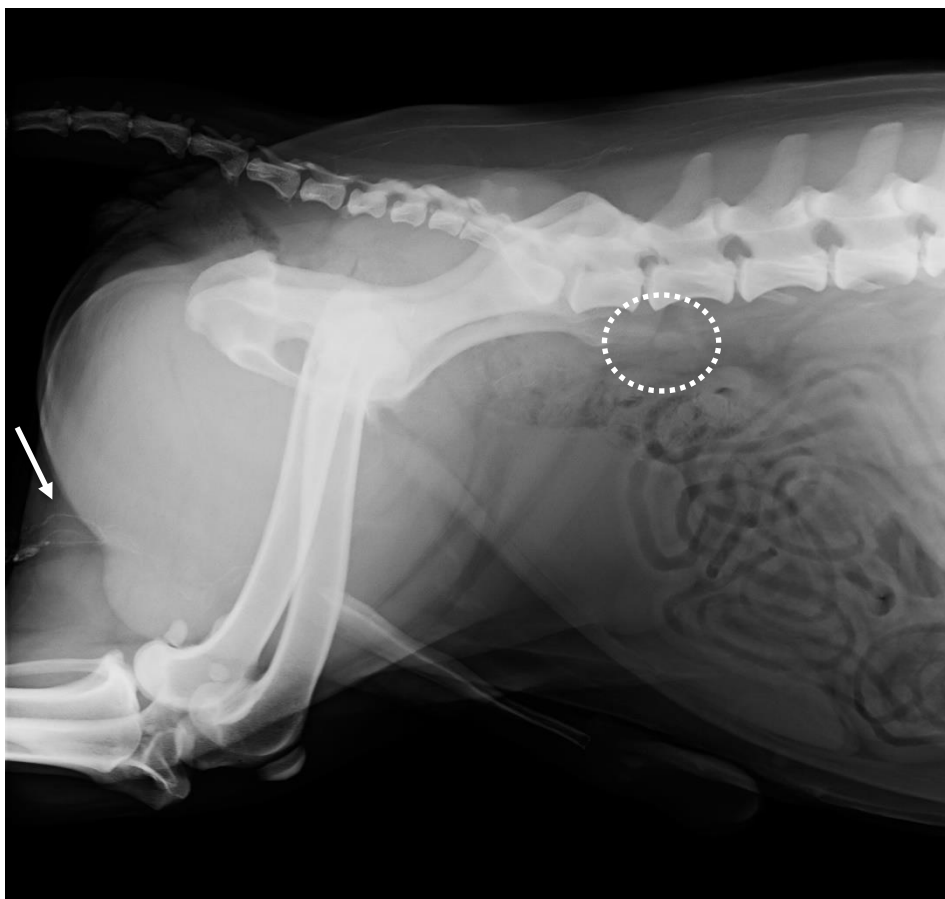


Figura 28 – Immagine radiografica in proiezione LL eseguita circa 3-5 minuti dopo l'iniezione peritumorale di un agente di contrasto iodato (Xenetix, iobitridolo 350). Nell'immagine si può osservare il percorso dei vasi linfatici (frecche bianche) che dal linfonodo popliteo risalgono verso l'addome (freccia bianca). Si può anche notare come il linfonodo iliaco abbia accumulato leggermente il mezzo di contrasto (cerchio bianco).

Dalle immagini ottenute si è identificato il linfonodo popliteo come il SLN e possibilmente il/i linfonodo/i iliaco/i come linfonodi di secondo livello e quindi potenzialmente metastatici. Conseguentemente, il chirurgo ha consigliato oltre all'amputazione del secondo dito e la rimozione del linfonodo popliteo, anche la rimozione del linfonodo iliaco ma i proprietari hanno dato il loro consenso solamente per le prime due procedure.

Diversamente dagli alti casi descritti non è stato utilizzato il blu di metilene in sede operatoria vista la facilità di riconoscimento del linfonodo popliteo megalico.

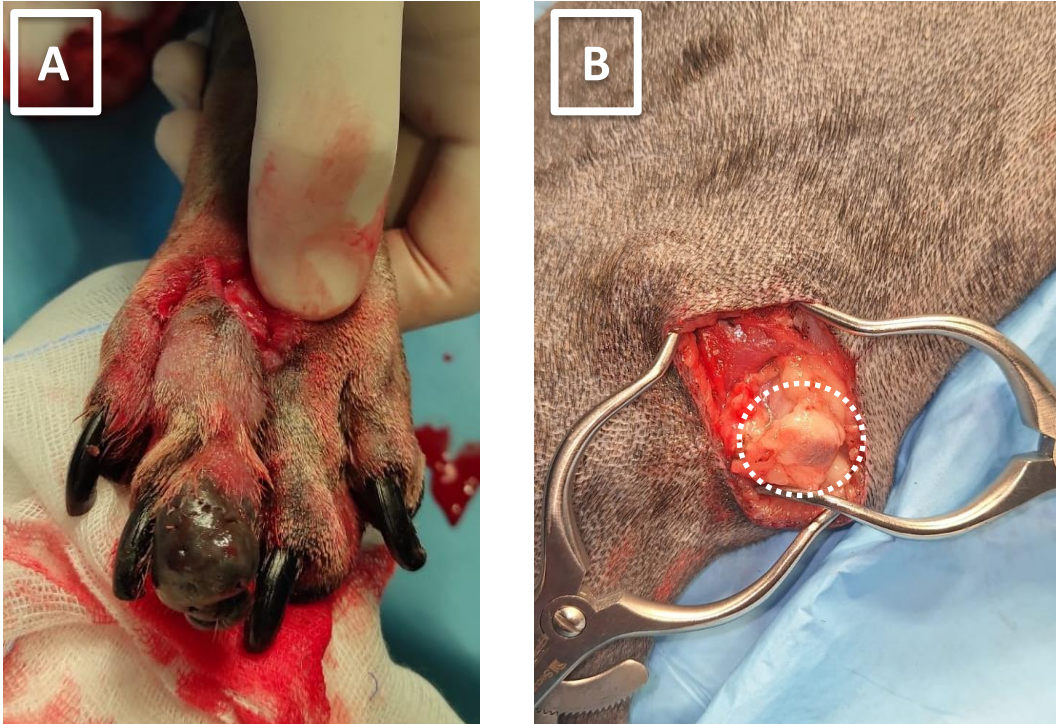


Figura 29 – Immagini intraoperatorie del piede sinistro (A) dove si può vedere la massa presente sul secondo dito e del linfonodo popliteo (cerchio bianco) (B).

Successivamente tutti i campioni di tessuto prelevati sono stati trasferiti al laboratorio per essere sottoposti a esame istopatologico; i risultati hanno confermato la diagnosi di melanoma della massa primaria mentre il linfonodo popliteo è risultato non metastatico. In seguito a questi risultati non è stato necessario sottoporre l'animale a ulteriori cure o trattamenti.

8. CONCLUSIONI

Sebbene l'oncologia veterinaria abbia fatto molta strada negli ultimi 60 anni, ci sono ancora grandi lacune nella conoscenza e nella comprensione delle neoplasie negli animali da compagnia. La comunità oncologica veterinaria dovrebbe muoversi per affrontare molte di queste questioni in sospeso attraverso programmi di ricerca clinica collaborativi, multicentrici e su larga scala (*Dobson, 2019*).

È ormai ovvio che il SLN abbia una posizione centrale nella stadiazione dei pazienti oncologici, tuttavia, l'identificazione dei SLN non viene ancora sfruttata in modo routinario in medicina veterinaria. Ciò si spiega probabilmente con il fatto che i veterinari, in questo momento, hanno una scarsa consapevolezza e conoscenza del valore di questa procedura e, soprattutto, perché non sono ancora accessibili in tutti i centri medici veterinari delle tecniche di mappatura facili e/o economiche che possiedano anche un'alta affidabilità nel riconoscimento dei SLN.

Il *gold standard* umano, ovvero la linfoscintigrafia utilizzata in parallelo con la mappatura intraoperatoria con colorante blu, ha dimostrato un grande potenziale anche in medicina veterinaria, ma rimane di difficile attuazione visti i costi ancora molto elevati degli strumenti per poter applicare la scintigrafia e gli accreditamenti necessari per poter lavorare con la medicina nucleare. Questi svantaggi purtroppo sono applicabili anche alla tecnica con sonda gamma che però ha ottenuto tassi di rilevamento dei SLN vicini al 100%.

La linfografia TC è utilizzata di routine in medicina umana ed è una tecnica molto più fattibile nell'oncologia veterinaria. Essa, infatti, fornisce una valutazione rapida e precisa del linfonodo, tuttavia possiede una relativamente bassa affidabilità rispetto ad altre tecniche e l'iniezione di contrasto iodato può dar luogo alla comparsa di alcuni effetti collaterali.

Anche la linfografia radiografica è una tecnica di mappatura molto semplice da attuare dato che tutte le cliniche e quasi tutti gli ambulatori veterinari possiedono gli strumenti necessari per effettuare delle radiografie, inoltre dagli studi riportati in questa tesi il tasso di rilevamento dei SLN con questa tecnica è risultato maggiore di quello ottenuto con la linfografia TC. Tuttavia, in mancanza di altri tipi di tecniche di mappatura, la linfografia TC può rivelarsi una buona tecnica da implementare nei centri veterinari che possiedono questo strumento, soprattutto se utilizzata in associazione con il blu di metilene per aumentarne l'affidabilità.

La CEUS e l'*imaging* NIR sono tecniche emergenti e promettenti in medicina umana, finora poco studiate in medicina veterinaria. Tuttavia, basandosi sugli studi presenti ad oggi in letteratura, si può affermare che entrambe posseggano una buona capacità di riconoscimento dei SLN anche se utilizzate come unica metodica e scarsi effetti collaterali.

Sebbene siano state descritte numerose tecniche per la mappatura dei SLN, la linfografia NIR sembra avere il più alto tasso di rilevamento dei SLN, e quindi rappresenta una tecnica degna di nota per una futura implementazione in medicina veterinaria (*Beer et al., 2023*).

In generale è possibile elevare il tasso di rilevamento di una qualsiasi delle tecniche descritte se abbinata ad altre metodiche, ad esempio utilizzando la linfografia radiografica in associazione con il blu di metilene come visto nei casi clinici riportati in questa tesi.

Study	Technique	Detection Rate	Tumor Type	Species
Brissot et al. 2016 [36] *	Radiographic lymphography	96%	various	dog
	Blue dye	86%		
	Correspondence rate between techniques	84%		
Rossi et al. 2018 [41]	CT Lymphography	60%	various	dog
Manfredi et al. 2021 [54]	Lymphoscintigraphy	95%	various	dog
Chiti et al. 2022 [26]	Lymphoscintigraphy + gamma probe + Methylene Blue	100%	various	cat
	NIR Lymphography	100%		
Gariboldi et al. 2022 [49]	Lymphoscintigraphy and Methylene Blue	87%	various scar revisions	dog
	NIR Lymphography	100%		
Randall et al. 2020 [61] *	Lymphoscintigraphy	100%	head and neck	dog
	Methylene Blue	94%		
	CT Lymphography	55%		
Wan et al. [47]	CT Lymphography	42%	Head and neck (oral)	dog
	Methylene Blue	50%		
	NIR Lymphography	91%		
	CT and Methylene Blue	100%		
Chiti et al. 2021 [13]	Lymphoscintigraphy	83%	various head and neck	dog

Collivignarelli et al. 2021 [59]	Radiographic lymphography	100%	mamma	dog
Majeski et al. 2017 [40]	CT lymphography	92%	AGASAC	dog
Worley et al. 2014 [20] *	Lymphoscintigraphy and Methylene Blue	95%	MCT	dog
	Gamma probe	100%		
Lapsley et al. 2020 [80]	CT Lymphography	90%	MCT	dog
Ferrari et al. 2020 [24]	Lymphoscintigraphy and Methylene Blue	91%	MCT	dog
Fournier et al. 2021 [25]	CEUS	95%	MCT	dog
De Bonis et al. 2022 [81]	Radiographic lymphography	90%	MCT	dog
Beer et al. 2022 [14]	NIR Lymphography	100%	MCT	dog

Tabella 2 – Tabella raffigurante alcuni degli studi veterinari presentati in questa tesi che hanno riportato la mappatura e i tassi di rilevamento dei SLN in animali affetti da neoplasia.

Tratto e modificato da Beer et al., 2023.

L'inclusione della linfoadenectomia del linfonodo sentinella nella terapia chirurgica dei tumori trova sempre più conferme in letteratura; tuttavia, i tumori sui quali oggi si dispone di maggiori informazioni sono i mastocitomi cutanei e sottocutanei, i tumori di testa e collo e i tumori mammari. In particolare, nel mastocitoma cutaneo e sottocutaneo del cane è stata registrata una presenza di metastasi occulte in linfonodi regionali e sentinella nel 50% dei casi, dimostrando sia il ruolo della linfoadenectomia nella stadiazione, sia nello sviluppo di una terapia (Stefanello, 2022). Infatti, i mastocitomi canini sono risultati i tumori che hanno avuto una miglior risposta al trattamento di linfoadenectomia.

La mappatura dei SLN, inoltre, potrebbe aiutare a sviluppare dei protocolli standardizzati per poter effettuare la linfoadenectomia in molte altre patologie oncologiche, ponendo così le basi per una valutazione dei benefici terapeutici di questa tecnica.

Sia l'oncologia umana che quella veterinaria trarrebbero beneficio da un miglioramento delle possibilità diagnostiche nei cani affetti da neoplasie. Gli animali potrebbero essere diagnosticati in modo più accurato e beneficerebbero delle nuove scoperte dei ricercatori umani, mentre gli oncologi umani potrebbero sfruttare informazioni aggiuntive ottenute attraverso dei modelli animali, dove la comparabilità e le applicazioni traslazionali sarebbero notevolmente migliorate (De Bie et al., 2021).

Nonostante negli anni si parli sempre di più dell'importanza del SLN in chirurgia oncologica veterinaria, per valutare l'impatto terapeutico concreto riguardo le patologie oncologiche e

per confermare e/o modificare i dati finora raccolti, sono necessari ulteriori studi che possano arruolare un numero sempre maggiore di pazienti, anche se questo dovrebbe andare di pari passo con l'interesse e la volontà dei veterinari, anche fuori dai maggiori centri di ricerca, ad attuare la ricerca dei linfonodi sentinella e a farla diventare una procedura di *routine* in presenza di pazienti oncologici.

BIBLIOGRAFIA

Baioni E., Scanziani E., Vincenti M.C., Leschiera M., Bozzetta E., Pezzolato M., Desiato R., Bertolini S., Maurella C., Ru G. *Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy.* BMC Vet Res. 2017.

Balsa I.M., Culp W.T.N. *Use of Minimally Invasive Surgery in the Diagnosis and Treatment of Cancer in Dogs and Cats.* Vet Sci. 2019.

Beer P., Chiti L.E., Nolff M.C. *The Role of Sentinel Node Mapping and Lymphadenectomies in Veterinary Surgical Oncology.* Lymphatics. 2023.

Beer P., Pozzi A., Rohrer Bley C., Bacon N., Pfammatter N.S., Venzin C. The role of sentinel lymph node mapping in small animal veterinary medicine: A comparison with current approaches in human medicine. *Vet Comp Oncol.* 2018.

Beer P., Rohrer-Bley C., Nolff M.C. *Near-infrared fluorescent image-guided lymph node dissection compared with locoregional lymphadenectomies in dogs with mast cell tumours.* J Small Anim Pract. 2022.

Brissot H.N., Ederly E.G. *Use of indirect lymphography to identify sentinel lymph node in dogs: a pilot study in 30 tumours.* Veterinary and Comparative Oncology, Volume 15, Issue 3. 2016.

Bujoreanu I., Gupta V. *Anatomy, Lymph Nodes.* Editore: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). 2022.

Calfee E.F. *The Role of the Surgeon in Veterinary Oncology.* Current Techniques in Small Animal Surgery, Teton NewMedia, Jackson, WY. 2014.

Cheng Z., Que H., Chen L., Sun Q., Wei X. *Nanomaterial-Based Drug Delivery System Targeting Lymph Nodes.* Pharmaceutics. 2022.

Chiti L.E., Gariboldi E.M., Ferrari R., Luconi E., Boracchi P., De Zani D., Zani D., Manfredi M., Spediacci C., Grieco V., Giudice C., Recordati C., Ferrari F., Stefanello D. *Surgical complications following sentinel lymph node biopsy guided by γ -probe and methylene blue in 113 tumour-bearing dogs.* Vet Comp Oncol. 2023

Chiti L.E., Gariboldi E.M., Stefanello D., De Zani D., Grieco V., Nolff M.C. *Sentinel Lymph Node Mapping and Biopsy in Cats with Solid Malignancies: An Explorative Study.* Animals (Basel). 2022.

Chiti L.E., Stefanello D., Manfredi M., Zani D.D., De Zani D., Boracchi P., Giudice C., Grieco V., Di Giancamillo M., Ferrari R. *To map or not to map the cNO neck: Impact of sentinel lymph node biopsy in canine head and neck tumours.* Vet Comp Oncol. 2021.

Collivignarelli F., Tamburro R., Aste G., Falerno I., Del Signore F., Simeoni F., Patsikas M., Gianfelici J., Terragni R., Attorri V., Carluccio A., Vignoli M. *Lymphatic Drainage Mapping with Indirect Lymphography for Canine Mammary Tumors.* Animals (Basel). 2021.

Culp W.T. *Interventional Oncology.* Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2016.

Di Virgilio F., Belluzzi E., Santos M., Caraty J., Bongartz A., Deneuche A. *Practice patterns about the role of palliation in veterinary surgical oncology.* Vet Comp Oncol. 2021.

De Bie P., Favril S., De Vos S., de Rooster H. *Peri-operative imaging techniques of the sentinel lymph node in veterinary oncology.* Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift. 2021.

De Bonis A., Collivignarelli F., Paolini A., Falerno I., Rinaldi V., Tamburro R., Bianchi A., Terragni R., Gianfelici J., Frescura P., Dolce G., Pagni E., Bucci R., Vignoli M. *Sentinel Lymph Node Mapping with Indirect Lymphangiography for Canine Mast Cell Tumour.* Vet Sci. 2022.

Dobson J.M. *Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs.* ISRN Vet Sci. 2013.

Dobson J.M. *Significant advances in veterinary oncology – 60 years on.* Journal of Small Animal Practice, Volume 60, Issue 12 p. 711-722. 2019.

Downing R. *Canine and feline end of life care.* In: Bruyette DS, editore. Clinical small animal internal medicine. Iowa, USA: John Wiley & Sons; p. 1555-64. 2020.

Du Bois H., Taylor A., Heim and Amanda W. Lund. *Tumor-Draining Lymph Nodes: At the Crossroads of Metastasis and Immunity.* Science Immunology. 2021.

Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G. *Testo di anatomia veterinaria, parte prima.* Antonio Delfino editore. Roma. Pag. 28-29/256-267. 2016.

Favril S., Abma E., Blasi F., Stock E., Devriendt N., Vanderperren K., De Rooster H. *Clinical use of organic near-infrared fluorescent contrast agents in image-guided oncologic procedures and its potential in veterinary oncology.* 2018.

Favril S., Stock E., Hernot S., Hesta M., Polis I., Vanderperren K., De Rooster H. *Sentinel lymph node mapping by near-infrared fluorescence imaging and contrast-enhanced ultrasound in healthy dogs.* Vet Comp Oncol. 2019.

Ferrari R., Boracchi P., Chiti L.E., Manfredi M., Giudice C., De Zani D., Spediacci C., Recordati C., Grieco V., Gariboldi E.M., Stefanello D. *Assessing the Risk of Nodal Metastases in Canine*

Integumentary Mast Cell Tumors: Is Sentinel Lymph Node Biopsy Always Necessary? Animals (Basel). 2021.

Ferraris E.I., Olimpo M., Giacobino D., Manassero L., Iussich S., Lardone E., Camerino M., Buracco P., Morello E.M. *Sentinel lymph node mapping with computed tomography lymphography for mast cell tumours and a comparison between regional and sentinel lymph node histological status: Sixty-two cases.* Vet Comp Oncol. 2023.

Fournier Q., Thierry F., Longo M., Malbon A., Cazzini P., Bisson J., Woods S., Liuti T., Bavcar S. *Contrast-enhanced ultrasound for sentinel lymph node mapping in the routine staging of canine mast cell tumours: A feasibility study.* Vet Comp Oncol. 2021.

Gariboldi E.M., Stefanello D., Nolff, M.C., De Zani D., Zani D., Grieco V., Giudice C., Recordati C., Ferrari F., Ferrari R., Chiti L.E. *Sentinel Lymph Node Biopsy Is Feasible in Dogs with Scars from Prior Local Excision of Solid Malignancies.* Animals 12, 2195. 2022.

Gariboldi E.M., Ubiali A., Chiti L.E., Ferrari R., De Zani D., Zani D.D., Grieco V., Giudice C., Recordati C., Stefanello D., Auletta L. *Evaluation of Surgical Aid of Methylene Blue in Addition to Intraoperative Gamma Probe for Sentinel Lymph Node Extirpation in 116 Canine Mast Cell Tumors (2017–2022).* Animals (Basel). 2023.

Gilson S.D. *Principles of surgery for cancer palliation and treatment of metastases.* Clin Tech Small Anim Pract. 1998.

Grimes J.A., Secret S.A., Northrup N.C., Saba C.F., Schmiedt C.W. *Indirect computed tomography lymphangiography with aqueous contrast for evaluation of sentinel lymph nodes in dogs with tumors of the head.* Vet Radiol Ultrasound. 2017.

Kudnig S.T., Séguin B., *Veterinary surgical oncology.* Pubblicato da John Wiley & Sons., Chichester, UK. 2022.

Lapsley J., Hayes G.M., Janvier V., Newman A.W., Peters-Kennedy J., Balkman C., Sumner J.P., Johnson P. *Influence of locoregional lymph node aspiration cytology vs sentinel lymph node mapping and biopsy on disease stage assignment in dogs with integumentary mast cell tumors.* Vet Surg. 2020.

Majeski S.A., Steffey M.A., Fuller M., Hunt G.B., Mayhew P.D., Pollard R.E. *Indirect computed tomographic lymphography for iliosacral lymphatic mapping in a cohort of dogs with anal sac adenocarcinoma: technique description.* Vet Radiol Ultrasound. 2017.

Manfredi M., De Zani D., Chiti L.E., Ferrari R., Stefanello D., Giudice C., Pettinato V., Longo M., Di Giancamillo M., Zani D.D. *Preoperative planar lymphoscintigraphy allows for sentinel*

lymph node detection in 51 dogs improving staging accuracy: Feasibility and pitfalls. Vet Radiol Ultrasound. 2021.

Marconato L., Foglia A., Il linfonodo regionale in oncologia veterinaria: sorvegliato speciale. 2021.

Mayer M.N., Silver T.I., Lowe C.K., Anthony J.M. *Radiographic lymphangiography in the dog using iodized oil.* Veterinary and Comparative Oncology, Volume 11, Issue 2. 2012.

Mulita F., Lotfollahzadeh S., Mukkamalla S.K.R. *Lymph Node Dissection.* In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2023.

Petrucci G.N., Henriques J., Lobo L., Vilhena H., Figueira A.C., Canadas-Sousa A., Dias-Pereira P., Prada J., Pires I., Queiroga F.L. *Adjuvant doxorubicin vs metronomic cyclophosphamide and meloxicam vs surgery alone for cats with mammary carcinomas: A retrospective study of 137 cases.* 2020.

Pinello K., Amorim I., Pires I., Canadas-Sousa A., Catarino J., Faisca P., Branco S., Peleteiro M.C., Silva D., Severo M., Niza-Ribeiro J. *Vet-OncoNet: Malignancy Analysis of Neoplasms in Dogs and Cats.* Vet Sci. 2022.

Pinello K., Baldassarre V., Steiger K., Paciello O., Pires I., Laufer-Amorim R., Oevermann A., Niza-Ribeiro J., Aresu L., Rous B., Znaor A., Cree I.A., Guscetti F., Palmieri C., Dagli M.L.Z. *Vet-ICD-O-Canine-1, a System for Coding Canine Neoplasms Based on the Human ICD-O-3.2.* Cancers (Basel). 2022.

Ram A.S., Matuszewska K., Petrik J., Singh A., Oblak M.L. *Quantitative and Semi-quantitative Methods for Assessing the Degree of Methylene Blue Staining in Sentinel Lymph Nodes in Dogs.* Front. Vet Sci. 2021.

Randall E.K., Jones M.D., Kraft S.L., Worley D.R. *The development of an indirect computed tomography lymphography protocol for sentinel lymph node detection in head and neck cancer and comparison to other sentinel lymph node mapping techniques.* Vet Comp Oncol. 2020.

Reif J.S. *Animal sentinels for environmental and public health.* Public Health Rep. 2011.

Repetti C.S.F., Rueda J.R., Porto C.D., Prevedello Franco R., Girio R.J.S., Manhoso F.F.R., Da Costa I.B. *Palliative care for cancer patients in veterinary medicine.* 2022.

Rosen R.D., Sapra A. *TNM Classification.* In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2023.

Rossanese M., Pierini A., Pisani G., Freeman A., Burrow R., Booth M., Marchetti V., Finotello R. *Ultrasound-guided placement of an anchor wire or injection of methylene blue to aid in the*

intraoperative localization and excision of peripheral lymph nodes in dogs and cats. J Am Vet Med Assoc. 2021.

Rossi F., Körner M., Suárez J., Carozzi G., Meier V.S., Roos M., Rohrer Bley C. *Computed tomographic-lymphography as a complementary technique for lymph node staging in dogs with malignant tumors of various sites.* Vet Radiol Ultrasound. 2018.

Sabattini S., Kiupel M., Finotello R., Stefanello D., Faroni E., Bertazzolo W., Bonfanti U., Rigillo A., Del Magno S., Foglia A., Aresu L., Gambini M., Caniatti M., Marconato L. *A retrospective study on prophylactic regional lymphadenectomy versus nodal observation only in the management of dogs with stage I, completely resected, low-grade cutaneous mast cell tumors.* BMC Vet Res. 2021.

Sarver A.L., Makielski K.M., DePauw T.A., Schulte A.J., Modiano J.F. *Increased risk of cancer in dogs and humans: a consequence of recent extension of lifespan beyond evolutionarily-determined limitations?* Aging Cancer. 2022.

Séguin B., McDonald D.E., Kent M.S., Walsh P.J., Théon A.P. *Tolerance of cutaneous or mucosal flaps placed into a radiation therapy field in dogs.* Vet Surg. 2005.

Sigmon D.F., Fatima S. *Fine Needle Aspiration.* In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

Stefanello Damiano. *Da chirurghi, proviamo a chiarirci le idee sul linfonodo sentinella.* Congresso SCIVAC Arezzo 2022, Chirurgia Oncologica: Il suo ruolo nella cura dei tumori. 2022.

Suami H., Yamashita S., Soto-Miranda M.A., Chang D.W. *Lymphatic Territories (Lymphosomes) in a Canine: An Animal Model for Investigation of Postoperative Lymphatic Alterations.* 2013.

Telloni S.M. *Tumor Staging and Grading: A Primer.* Methods Mol Biol. 2017.

Vascellari M., Foiani G. *SCS3 Diagnostica specialistica, istopatologia e parassitologia, cp. 22: I tumori del cane e del gatto.* IZSve. 2022.

Villalobos A.E. *Quality-of-life assessment techniques for veterinarians.* Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2011.

Wan J., Oblak M.L., Ram A., Singh A., Nykamp S. *Determining agreement between preoperative computed tomography lymphography and indocyanine green near infrared fluorescence intraoperative imaging for sentinel lymph node mapping in dogs with oral tumours.* Vet Comp Oncol. 2021.

Withrow S.J. *Surgical Oncology.* Veterinary Quarterly. 1998.

Worley D.R. *Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures.* Vet Comp Oncol. 2014.

Wright T., Oblak M.L. *Lymphadenectomy: Overview of surgical anatomy & removal of peripheral lymph nodes.* 2016.

Wustefeld-Janssens B., Smith L., Wilson-Robles H. *Neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in veterinary cancer treatment: a review.* J Small Anim Pract. 2021.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio in primis la Professoressa De Benedictis per la passione che ha sempre dimostrato e trasmesso nei suoi insegnamenti in questo corso di laurea, e per la disponibilità che ha avuto nei miei confronti durante la stesura della tesi.

Ringrazio anche il Dottor Rametta che è riuscito a farmi amare ancora di più la professione e che mi ha dato suggerimenti preziosi per questo progetto.

Ringrazio inoltre i miei genitori Silvia e Giovanni per avermi sempre sostenuto e per avermi permesso di seguire i miei sogni.

Un ringraziamento particolare va al mio fidanzato Michele per essermi sempre stato a fianco in questi anni, per avermi supportato ogni giorno e per avermi aiutato a diventare la versione migliore di me stessa.

Infine ringrazio la mia amica e collega Elisa per essermi stata accanto e per aver pianto e gioito insieme a me durante questo significativo periodo.

Grazie Ale.