



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELA FARIAS DA NÓBREGA

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E SOBREVIDA DE CÃES
COM HEMANGIOSSARCOMA CUTÂNEO**

DANIELA FARIAS DA NÓBREGA

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E SOBREVIDA DE CÃES
COM HEMANGIOSSARCOMA CUTÂNEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula F. R. L.
Bracarense

Londrina – PR
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Nóbrega, Daniela Farias da.

Análise imuno-histoquímica e sobrevivência de cães com hemangiossarcoma cutâneo / Daniela Farias da Nóbrega. - Londrina, 2018.
53 f. : il.

Orientador: Ana Paula F R L Bracarense.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. Biomarcadores - Tese. I. Bracarense, Ana Paula F R L. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . III. Título.

DANIELA FARIAS DA NOBREGA

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E SOBREVIDA DE CÃES
COM HEMANGIOSSARCOMA CUTÂNEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Giovana Wingeter Di Santis
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Renee Laufer Amorim
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Campus de Botucatu

Londrina, 26 de fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha orientadora Prof^a Ana Paula F. R. L. Bracarense por acreditar no meu trabalho, pela orientação plena, seriedade, sensibilidade e apoio em todos os momentos. Será sempre meu maior exemplo de ética e amor pela patologia.

Ao Prof Selwyn e Prof^a Giovana pelos ensinamentos que também contribuíram com esse trabalho a aos residentes do Laboratório de Patologia por todo apoio e esforço em fazer bons diagnósticos. A Vanessa Sehaber pela disponibilidade, competência e colaboração essencial nesse trabalho.

Agradeço aos meus pais, irmãos e agregados, pelo carinho, respeito e amor sempre. A Leka e Lola pela inspiração e amor incondicional. Aos grandes amigos que me acompanharam nessa fase. Leila pela amizade absoluta, por compartilhar e me apoiar nos piores e melhores dias. Juliana Rubira pelo carinho e bom humor de todas as manhãs. Thalita pela cumplicidade, companheirismo e ajuda em todas as fases.

A Jéssica pela serenidade, parceria e ter se tornado uma irmã. Alcides também pelo apoio e companheirismo. E muitos outros amigos que fizeram dessa etapa um grande aprendizado profissional e pessoal.

Também agradeço pela gestão da equipe do PMP/Paraná pela compreensão em alterações de escala de trabalho que permitiu que este estudo fosse realizado, e o apoio e amizade diários da Nane, Isabela, Roberta e Ana Júlia.

**“O caos é uma ordem por decifrar” José
Saramago**

1 NÓBREGA, Daniela Farias. **Análise imuno-histoquímica e sobrevida de cães com**
2 **hemangiossarcoma cutâneo**. 2018. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
3 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

6 RESUMO

10 O hemangiossarcoma (HSA) é uma neoplasia maligna de células endoteliais de vasos
11 sanguíneos e pode ocorrer em diversos tecidos. É frequente em cães e apresenta comportamento
12 biológico agressivo, que associado a protocolos terapêuticos ineficientes resulta em alta
13 mortalidade dos animais. Não há na literatura atual estudos sobre a relação de expressão de
14 marcadores imuno-histoquímicos e prognóstico de cães com HSA cutâneo. O objetivo deste
15 trabalho foi determinar a expressão de marcadores imuno-histoquímicos e relacionar com a
16 sobrevida de cães com HSA cutâneo. Foram avaliados o índice de marcação de fator VIII
17 (fVIII), cicloxigenase-2 (COX-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF),
18 *proliferation cell nuclear antigen* (PCNA) e caspase-3 (Casp-3) por meio da imuno-
19 histoquímica em 60 amostras de HSA cutâneo. Estas variáveis foram relacionadas com a
20 sobrevida dos animais por meio da análise de sobrevivência usando o modelo de riscos
21 competitivos. Adicionalmente, verificou-se a relação da idade, sexo, raça, graduação tumoral,
22 grau de diferenciação histológica e tamanho do tumor com a sobrevida dos cães. A média de
23 idade dos animais foi 8,5 anos. As raças mais frequentes foram sem raça definida, Pit Bull,
24 Boxer e Teckel e as localizações anatômicas mais comuns a inguinal e abdominal. A expressão
25 dos marcadores foi positiva em 80 a 100% das amostras. A intensidade de marcação
26 predominante foi fraca a moderada para fVIII, COX-2 e VEGF. O tempo médio de sobrevida
27 dos cães foi 16,5 meses e a mediana 12 meses. A idade dos cães, graduação tumoral, grau de
28 diferenciação histológica e tamanho dos tumores não apresentaram relação com a sobrevida
29 ($p>0,05$). Houve uma tendência dos cães de raças predispostas a terem sobrevida maior em
30 comparação aos cães de raças não predispostas. Os cães que apresentaram outras neoplasias
31 primárias concomitantes tiveram curva de sobrevida maior do que cães que tinham apenas HSA,
32 e desse grupo as fêmeas apresentaram sobrevida menor ($p=0,03$) pelo teste de Gray. O índice
33 de marcação de fVIII, COX-2, VEGF, PCNA e Casp-3 não apresentou relação com a sobrevida,
34 assim como a intensidade de marcação de fVIII, COX-2 e VEGF. Os resultados do presente
35 trabalho indicam que as variáveis imuno-histoquímicas analisadas dos HSA cutâneos não
36 apresentaram associação com a sobrevida dos animais, no entanto a expressão frequente de
37 COX-2 e VEGF sugerem a necessidade de ampliação dos estudos com esses marcadores.

40 **Palavras-chave:** Biomarcadores. Canino. Pele. Prognóstico. Tumor vascular maligno.

1 NÓBREGA, Daniela Farias. **Immunohistochemical analysis and survival of dogs with**
2 **cutaneous hemangiosarcoma**. 2018. 50 f. Dissertation (Master's Degree in Animal Science)
3 – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.
4
5

6 ABSTRACT 7 8

9 Hemangiosarcoma (HSA) is a malignant neoplasm of vascular endothelial cells and may arise
10 in any tissue. It is frequent in dogs and exhibits aggressive biological behavior, which, together
11 with ineffective therapeutic protocols, results in high mortality of the animals. There are no
12 studies in the literature associating immunohistochemical expression of markers and survival
13 of dogs with cutaneous HSA. The aim of this study was to determine the expression of
14 immunohistochemical markers and to correlate with survival of dogs with cutaneous HSA. Was
15 evaluated the index of labeling of factor VIII (fVIII), cyclooxygenase-2 (COX-2), vascular
16 endothelial growth factor (VEGF), proliferation cell nuclear antigen (PCNA) and caspase-3
17 (Casp-3) by immunohistochemistry in 60 samples of canine cutaneous HSA. These variables
18 were associated with the survival of animals through the analysis of survival, in the model of
19 competitive risks. In addition, was verified the relation of age, sex, breed, tumor grade, score
20 of histological differentiation and tumor size with survival of the dogs. The mean age of the
21 animals was 8.5 years. The most frequent breeds were mixed breed, Pit Bull, Boxer and Teckel
22 and the most common anatomical locations were inguinal and abdominal. The expression of
23 the markers was positive in 80 to 100% of the samples, predominantly with weak to moderate
24 labeling intensity in fVIII, COX-2 and VEGF and strong in PCNA and Casp-3. The mean
25 survival time of dogs was 16.5 months, and median was 12 months. The age of the dogs, tumor
26 grade, score of histological differentiation and size of tumors were not related to survival
27 ($p>0.05$). There was a tendency of dogs of predisposed breeds to have greater survival,
28 compared to dogs of not predisposed breeds. The dogs that had other concomitant primary
29 neoplasms had a longer survival curve than dogs that had only HSA, and of this group the
30 females presented lower survival ($p=0.03$) by the Gray's test. The labelling index of fVIII,
31 COX-2, VEGF, PCNA and Casp-3 had no relation with survival time, as well as the labelling
32 intensity of fVIII, COX-2 and VEGF. Results of the present study indicate that the
33 immunohistochemical variables analyzed in cutaneous HSA were not associated with survival
34 time of the animals. However, the frequent expression of COX-2 and VEGF suggest the need
35 to extend the studies with these markers.
36

37 **Key words:** Biomarkers. Canine. Malignant vascular tumor. Prognosis. Skin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 – Canine cutaneous hemangiosarcoma, histopathology and immunohistochemistry	38
Figure 2 – Survival curves of dogs with cHSA of group 1 and 2.....	40
Figure 3 – Survival curves of dogs with cHSA classified in groups of breeds	41
Figure 4 – Survival curves of female and male dogs with cHSA.....	41

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Primary antibodies used in immunohistochemistry.....	35
Table 2 – Summary of immunohistochemical labelling of canine cutaneous hemangiosarcoma	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Casp-3	Caspase-3
cHSA	<i>Cutaneous hemangiosarcoma</i>
COX-2	Cicloxygenase-2/ <i>Cyclooxygenase-2</i>
fVIII	Fator VIII/ <i>factor VIII</i>
HA	Hemangioma
HSA	Hemangiossarcoma/ <i>hemangiosarcoma</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
PCNA	<i>Proliferationg Cell Nuclear Antigen</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	INTRODUÇÃO	13
2.2	INCIDÊNCIA E ETIOLOGIA	13
2.3	SINAIS CLÍNICOS.....	14
2.4	DIAGNÓSTICO	15
2.5	BIOMARCADORES.....	16
2.6	TRATAMENTO	19
2.7	PROGNÓSTICO	21
2.8	CONCLUSÃO.....	22
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	ARTIGO	29
5	CONCLUSÃO	51

1 INTRODUÇÃO

Os hemangiossarcomas (HSA) são neoplasias malignas de células endoteliais de vasos sanguíneos e podem ocorrer em diversos tecidos (BROWN et al., 1985; PATNAIK; MACEWEN, 1985; SMITH, 2003). Os órgãos mais afetados são o baço, fígado, átrio direito e pele (BROWN; PATNAIK; MACEWEN, 1985; SMITH, 2003; SABATTINI; BETTINI, 2009). São frequentes em cães e a localização cutânea geralmente está associada a tempo de sobrevida reduzido (SCHULTHEISS, 2004; SHIU et al., 2011). A radiação solar tem sido atribuída como um fator predisponente para o surgimento do HSA cutâneo, ocorrendo com frequência em cães de pelo curto e pele pouco pigmentada (HARGIS et al., 1992; NIKULA et al., 1992). Portanto, lesões actínicas e hemangioma pode preceder a forma maligna por longo período de tempo (HARGIS et al., 1992). HSA induzido pela luz solar apresenta melhor prognóstico após a excisão cirúrgica, comparado a forma não induzida pela radiação solar (SZIVEK et al., 2012).

As regiões da pele mais acometidas são ventroabdominal, prepucial e membros pélvicos (FERNANDES, 2008). Ward (1994) propôs uma graduação para o HSA cutâneo baseado em sua localização e invasão histológica: lesões limitadas à derme (estágio 1), localizadas na hipoderme com ou sem envolvimento da derme (estágio 2) e lesões com invasão da camada muscular (estágio 3).

Macroscopicamente, esses tumores cutâneos se apresentam como pápulas a massas elevadas na pele, macias a firmes, de coloração vermelho escuro e frequentemente com ulceração e hemorragia (FERNANDES, 2008; GROSS et al. 2008). O tratamento baseia-se na excisão cirúrgica associada à quimioterapia adjuvante (doxorrubicina e ciclofosfamida), entretanto os protocolos quimioterápicos atualmente utilizados não prolongam a sobrevida dos cães satisfatoriamente. Contudo, outras abordagens terapêuticas vêm sendo investigadas, baseadas na expressão de moléculas pelas células neoplásicas.

Dois estudos avaliaram o tempo de sobrevida de cães com HSA cutâneo, e apresentaram mediana de 987 dias (SZIVEK et al., 2012) e 780 dias para tumores em grau 1, 172 dias para grau 2 e 307 dias para grau 3 (WARD et al., 1994). A relação entre alguns fatores e o tempo de sobrevida dos cães foi avaliada por esses autores e foram identificados como indicativos de prognóstico a raça, localização da

1 lesão quanto à invasão histológica (gradação) e presença de ceratose actínica (WARD
2 et al., 1994; SZIVEK et al., 2012).

3 Marcadores imuno-histoquímicos vem sendo utilizados com o objetivo
4 da caracterização molecular de neoplasias vasculares em cães e seres humanos. Dentre
5 os mais citados estão o fator VIII (fVIII), CD31, Ki-67, *Vascular endothelial growth*
6 *factor* (VEGF) e fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), que apresentaram
7 resultados variados de expressão imuno-histoquímica. Os marcadores Ki-67 e
8 *Proliferationg Cell Nuclear Antigen* (PCNA) refletem o índice proliferativo da
9 neoplasia. O fVIII ou fator de von Willebrand, assim como o CD31, são proteínas
10 intracitoplasmáticas de células endoteliais, e são utilizadas para distinguir HSA pouco
11 diferenciado de outras neoplasias mesenquimais. Porém, a expressão de fVIII nas
12 células endoteliais malignas é fraca devido ao processo neoplásico de indiferenciação
13 (SABATTINI e BETTINI, 2009) e a positividade para CD31 pode ocorrer em outras
14 neoplasias caninas (RAMOS-VARA et al., 2018).

15 A COX-2 é expressa em diversas condições/estímulos celulares como
16 inflamação, citocinas e neoplasias (TAKETO, 1998). Essa enzima participa da
17 progressão neoplásica de diferentes formas: inibe a apoptose, estimula a expressão de
18 moléculas proangiogênicas como o VEGF, induz a capacidade de invasão e ativa
19 moléculas carcinogênicas (HELLER et al., 2005). As caspases são mediadores da morte
20 celular programada (apoptose), responsável pela ativação de fatores que fragmentam o
21 DNA celular, portanto são úteis para entender o mecanismo de evasão da supressão
22 celular. Outro marcador celular que vem sendo estudado na oncologia é o VEGF e seus
23 receptores. Este é um dos fatores envolvidos na angiogênese, ou seja, na proliferação,
24 diferenciação e migração de células endoteliais. Um estudo com HSA canino relacionou
25 a expressão desse marcador e seu receptor flk-1 com a progressão maligna dessa
26 neoplasia (YONEMARU et al., 2006).

27 Os estudos de caracterização molecular do HSA promovem avanços
28 importantes acerca da fisiopatologia dessa neoplasia, o que gera aporte para abordagens
29 terapêuticas eficientes, direcionadas a moléculas alvos. Além disso, a imunodeteção de
30 proteínas expressas nas células neoplásicas pode ser útil na determinação de fatores
31 prognósticos. Essas descobertas possivelmente representam maior sobrevida e
32 expectativa de cura de cães acometidos por HSA, além de prover um modelo para
33 estudo de neoplasias vasculares em seres humanos (WANG et al., 2017).

1 Contudo, na literatura atual há estudos escassos sobre a relação de
2 expressão de marcadores imuno-histoquímicos e sobrevida de cães com HSA cutâneo,
3 fato que dificulta a definição de fatores prognósticos seguros, determinação do
4 comportamento biológico e aporte para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos
5 eficientes.

6 7 **2 REVISÃO DE LITERATURA**

8 9 2.1 INTRODUÇÃO

10
11 A oncologia veterinária tem recebido maior atenção nos últimos anos
12 devido ao aumento da prevalência de doenças neoplásicas em animais de companhia, o
13 que ocorre principalmente pelo aumento da expectativa de vida desses animais. A
14 expansão de estudos na oncologia veterinária traz benefícios também à medicina
15 humana, fato relacionado às semelhanças entre neoplasias na espécie canina e humana.
16 Dessa forma o cão tornou-se um excelente modelo para o estudo e avanço da oncologia
17 humana, sobretudo nas neoplasias vasculares malignas (WANG et al., 2017).

18 O hemangiossarcoma (HSA), também conhecido como
19 hemangioendotelioma maligno ou angiossarcoma, é uma neoplasia maligna de células
20 endoteliais vasculares e pode surgir em qualquer tecido vascularizado (BROWN;
21 PATNAIK; MACEWEN, 1985; SMITH, 2003). Este tipo de tumor é mais frequente em
22 cães e ocorre raramente em outras espécies animais (SMITH, 2003). O HSA canino
23 apresenta semelhanças genéticas e comportamentais com o angiossarcoma em humanos
24 (HEISHIMA et al., 2015). Os órgãos mais acometidos pelo HSA em cães são o baço,
25 fígado, átrio direito e pele (BROWN; PATNAIK; MACEWEN, 1985; SMITH, 2003;
26 SABATTINI; BETTINI, 2009). A lesão pode ser solitária ou apresentar-se como uma
27 síndrome multicêntrica, envolvendo vários órgãos concomitantemente (HENDRICK,
28 2016).

29 30 2.2 FATORES EPIDEMIOLÓGICOS E ETIOLOGIA

31
32 Os cães afetados por HSA cutâneo geralmente são idosos, com média
33 de idade de 8,9 a 9,7 anos (WARD et al., 1994; SCHULTHEISS, 2004; SZIVEK et al.,

1 2012), porém animais jovens, de até três anos de idade, podem ser acometidos
2 (SCHULTHEISS, 2004; SZIVEK et al., 2012). Essa neoplasia cutânea tem predileção
3 por cães de pelo curto e pele pouco pigmentada, como cães das raças Whippet, Pit Bull,
4 Beagle, Boxer, Dálmata e Basset Hound (HARGIS et al., 1992; SCHULTHEISS, 2004;
5 SZIVEK et al., 2012) e não há predisposição sexual (WARD et al., 1994;
6 SCHULTHEISS, 2004; SZIVEK et al., 2012). O HSA não visceral representa menos de
7 1% das neoplasias caninas (SCHULTHEISS, 2004).

8 A etiologia do HSA cutâneo em cães é desconhecida, porém a
9 radiação solar é atribuída como um fator predisponente para o surgimento dessa
10 neoplasia, devido a ocorrência frequente em cães de pelo curto e com pele pouco
11 pigmentada, principalmente em regiões de pele glabra associada a presença de lesões
12 actínicas (HARGIS et al., 1992; NIKULA et al., 1992). Um estudo sugere que na forma
13 da doença induzida pela luz solar os animais têm tempo de sobrevivência maior em
14 comparação com a forma não induzida (SZIVEK et al., 2012). Em humanos a
15 ocorrência do HSA está associada à radioterapia, radiação solar, exposição a
16 arsênio, cloretos de vinil e dióxido de tório (BRENN; FLETCHER, 2005).

17

18 2.3 SINAIS CLÍNICOS

19

20 Os cães com HSA cutâneo geralmente apresentam lesões visíveis na
21 superfície da pele. A localização mais frequente é onde há pele glabra ou com pouco
22 pelo, como as regiões abdominal ventral e inguinal (HARGIS et al., 1992; WARD et al.,
23 1994; SZIVEK et al., 2012). As características macroscópicas dessa neoplasia podem
24 variar de acordo com a localização. Tumores limitados à derme se apresentam como
25 placas ou nódulos pouco delimitados de coloração vermelha escura que medem em
26 geral poucos centímetros, com frequente ulceração e hemorragia. Já os HSA que
27 envolvem as camadas subcutânea e/ou muscular são maiores, macios, mal delimitados
28 e se assemelham a grandes hematomas (GROSS et al., 2008).

29

30 Frequentemente, os cães com HSA cutâneo (28%) apresentam
31 múltiplas outras lesões cutâneas com o mesmo diagnóstico (WARD et al., 1994) ou
32 hemangiomas (HA), que podem se transformar em HSA devido a mutações induzidas
33 pela radiação ultravioleta (HARGIS et al., 1992). A metástase ocorre com maior
frequência nos pulmões, órgãos abdominais, tais como o fígado, baço e epíplon, e no

1 sistema nervoso central (BROWN; PATNAIK; MACEWEN, 1985; CLIFFORD et al.,
2 2001). A recorrência do HSA cutâneo é comum após a excisão cirúrgica e ocorre em
3 77% dos cães (SZIVEK et al., 2012).

4 O estadiamento clínico baseado no sistema TNM também é utilizado
5 em cães com HSA, de acordo com o seguinte método: T₀ é denominado quando não há
6 evidência de tumor, T₁ quando o tumor é menor que 5 cm de diâmetro e limitado ao
7 sítio primário, T₂ em tumores maiores que 5 cm de diâmetro ou rompido, invadindo o
8 tecido subcutâneo e T₃ quando o tumor invade os tecidos adjacentes inclusive músculo;
9 N₀ é designado quando não há envolvimento de linfonodos, N₁ quando há afecção de
10 linfonodo regional e N₂ quando há envolvimento de linfonodo distante; M₀ é atribuído
11 quando metástase é ausente e M₁ quando há metástase distante; grau I: T₀ ou T₁, N₀,
12 M₀, grau II: T₁ or T₂, N₀ or N₁, M₀ e grau III T₂ or T₃, N₀, N₁ or N₂, M₁ (THAMM,
13 2013).

14

15 2.4 DIAGNÓSTICO

16

17 O exame citopatológico pode apresentar diagnóstico sugestivo de
18 HSA, com critérios definidos como formações vasculares com lúmen microacinar ou
19 intracitoplasmático, fundo com grande quantidade de hemácias, eritrofagocitose e
20 apoptose, porém as variações histológicas dessa neoplasia pode gerar um diagnóstico
21 citopatológico equivocado (BERTAZZOLO et al., 2005). O exame histopatológico é
22 necessário para o diagnóstico definitivo de HSA. Porém alguns tumores pouco
23 diferenciados necessitam de exame imuno-histoquímico para ser distinguidos de outros
24 sarcomas (GROSS et al., 2008).

25

26 O HSA cutâneo pode ser graduado em estágio/grau I, II e III, de
27 acordo com a invasão histológica. Tumores limitados à derme são denominados estágio
28 I, HSA primário da hipoderme que invade ou não a derme é estágio II e tumores da
29 derme ou hipoderme que invadem a camada muscular são classificados em estágio III
30 (WARD et al., 1994). Essa classificação é relevante, pois tem relação com o tempo de
31 sobrevivência dos cães (WARD et al., 1994). Há também uma variação histológica
32 denominada HSA epitelióide, cujas células são maiores e mais redondas, semelhantes às
33 células epiteliais, apresenta arranjo mais sólido e possui aparentemente comportamento
clínico semelhante às formas não epitelióides (WARREN; SUMMERS, 2007).

1 Microscopicamente, essa neoplasia se apresenta de diferentes formas,
2 geralmente é mal delimitada e invasiva, composta por proliferação de células endoteliais
3 formando canais vasculares irregulares com trabéculas de tecido conjuntivo preenchidos
4 por variada quantidade de hemácias (GROSS et al., 2008; SABATTINI; BETTINI,
5 2009). As células apresentam núcleo oval a epitelióide e hipercromático com nucléolos
6 inconspícuos e o índice mitótico pode variar de baixo a alto com mitoses atípicas
7 (GROSS et al., 2008). Frequentemente observa-se acantose, ulceração, trombose e
8 hemorragia no interior da neoplasia e no tecido adjacente (GROSS et al., 2008).

9 O HSA induzido pela luz solar geralmente está associados a alterações
10 na derme superficial como a elastose solar, a dilatação de vasos não neoplásicos e por
11 vezes outras neoplasias cutâneas concomitantemente, como o HA e o carcinoma de
12 células de escamosas, também relacionados à radiação ultravioleta (GROSS et al.,
13 2008).

14 A partir do diagnóstico de HSA cutâneo confirmado é importante
15 avaliar se há envolvimento de órgãos abdominais através do exame ultrassonográfico,
16 radiografia, ecocardiografia ou tomografia, visto que um estudo demonstrou que 60% dos
17 animais que tinham HSA cutâneo, apresentavam também HSA visceral concomitante
18 (HARGIS et al., 1992).

19 20 2.5 BIOMARCADORES

21
22 O estudo imuno-histoquímico das neoplasias é essencial para a
23 caracterização molecular e compreensão do comportamento biológico, auxiliando no
24 diagnóstico e obtenção de terapias mais efetivas, direcionadas a moléculas específicas.

25 Os primeiros marcadores imuno-histoquímicos a serem descritos e
26 ainda os mais utilizados no HSA canino são o fator VIII (fVIII ou fator de von
27 Willebrand) e CD31. Esses marcadores possuem especificidade para células endoteliais
28 e são utilizados para confirmar o diagnóstico ou distinguir outras neoplasias de origem
29 mesenquimal de HSA pouco diferenciado (SABATTINI; BETTINI, 2009).

30 Estudos prévios demonstraram que a expressão do fVIII é
31 consistentemente positiva em HSA canino, pois apresentam imunomarcagem em 88 a
32 100% dessas neoplasias (VON BEUST; SUTER; SUMMERS, 1988; WARREN;
33 SUMMERS, 2007; SABATTINI; BETTINI, 2009). Sabattini et al. (2009) relataram

1 marcação de fVIII mais intensa em tecido de granulação e HA, comparado ao HSA que
2 apresentaram marcação fraca, fato que caracteriza a pouca diferenciação dessa neoplasia
3 maligna. O CD31 apresentou imunomarcação em 95 a 100% dos HSA em cães,
4 caracterizando uma maior sensibilidade para a marcação de células endoteliais
5 (FERRER et al., 1995; BERTAZZOLO et al., 2005).

6 O fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial*
7 *growth factor* = VEGF) é uma das proteínas mais potentes envolvidas na angiogênese
8 tumoral, pois promove a proliferação, crescimento e migração de células endoteliais,
9 além de induzir aumento de permeabilidade vascular, produção de metaloproteinases e
10 inibição da resposta inflamatória, favorecendo o crescimento rápido e a ocorrência de
11 metástases (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). Esse marcador tem sido amplamente
12 estudado na oncologia veterinária, sobretudo em HSA canino (CLIFFORD et al., 2001;
13 YONEMARU et al., 2006; KODAMA et al., 2009; CAMPOS et al., 2012).

14 Estudos demonstraram a expressão imuno-histoquímica de VEGF
15 (CAMPOS et al., 2012) e seus receptores como o VEGFR-2 (ADACHI et al., 2016b),
16 VEGFR-3 (SABATTINI; BETTINI, 2009), flt-1 e flk-1 (YONEMARU et al., 2006) em
17 HSA cutâneo e visceral de cães e sua relação com a progressão maligna dessa neoplasia.
18 A presença de VEGF também foi mensurada no plasma de cães com HSA não cutâneo
19 (n=16) e saudáveis (n=17) utilizando o método de ELISA, sendo que o nível sérico de
20 VEGF foi significativamente maior em cães com neoplasia, sem haver no entanto,
21 associação com o estágio da doença (CLIFFORD et al., 2001). Recentemente, em um
22 estudo *in vitro* com células de HSA submetidas a inibidores de VEGFR-2 observou-se
23 aumento da atividade apoptótica (ADACHI et al., 2016a). Também o fator de
24 crescimento fibroblástico básico (bFGF) foi considerado outra importante molécula
25 envolvida na proliferação celular do HSA canino (YONEMARU et al., 2006).

26 O *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) é comumente
27 encontrado na fase G1 e G2 do ciclo celular e está envolvido no reparo de DNA,
28 alterações na replicação e organização da cromatina, sendo que na imuno-histoquímica
29 é utilizado como marcador de proliferação celular (CAPPELLO et al., 2006). Em
30 neoplasias vasculares de cães, a expressão de PCNA foi avaliada somente em HA e
31 HSA oculares, os quais apresentaram imunomarcação em mais de 50% das células, em
32 todas as amostras de ambas as neoplasias (CHANDLER et al., 2009). Outro importante
33 marcador de proliferação celular, o Ki-67, apresentou índice médio de 16,7% nos HSA

1 e ausência de marcação em HA (SABATTINI; BETTINI, 2009), demonstrando a alta
2 capacidade proliferativa dessa neoplasia maligna.

3 Outra molécula estudada através da imuno-histoquímica foi o c-kit
4 (CD117) que apresentou marcação citoplasmática na maioria dos HSA caninos com
5 intensidade variável, em contraste com expressão ausente em quase todos os tumores
6 vasculares benignos (SABATTINI; BETTINI, 2009; CHEN et al., 2016). Resultados
7 semelhantes foram descritos em angiossarcomas humanos (MIETTINEN; SARLOMO-
8 RIKALA; LASOTA, 2000). Esses achados suportam a teoria de que os HSA caninos e
9 os angiossarcomas humanos são originados de células endoteliais primitivas e pouco
10 diferenciadas, dado que o c-kit é um receptor de fatores de crescimento de células
11 tronco e mastócitos (SABATTINI; BETTINI, 2009).

12 A ciclooxigenase-2 (COX-2) tem apresentado importância crescente
13 na determinação de prognóstico de inúmeras neoplasias e na terapêutica oncológica na
14 medicina humana (KURTOVA et al., 2015; HU et al., 2017; HUANG et al., 2017). Os
15 mecanismos em que a COX-2 contribui para o desenvolvimento tumoral e progressão
16 maligna incluem a inibição da apoptose celular, promoção da angiogênese, aumento de
17 células potencialmente invasoras, atividade imunomoduladora e conversão de pró-
18 carcinógenos em carcinógenos (FOSSLIEN, 2001). Quanto à angiogênese, a
19 participação da COX-2 tem sido comprovada pela regulação da expressão de moléculas
20 como VEGF, bFGF e fator de crescimento derivado de plaquetas (DEMPKE et al.,
21 2001).

22 Na medicina veterinária há poucos estudos de COX-2 em HSA
23 canino. Heller et al. (2005) avaliaram esse marcador em HSA esplênicos, sarcomas
24 histiocíticos e mastocitomas caninos, através da imuno-histoquímica, e não observaram
25 expressão significativa nessas neoplasias. Outros autores demonstraram imunomarcção
26 de COX-2 em diversas outras neoplasias em cães, porém há grande divergência de
27 resultados quando utilizado o mesmo tipo de neoplasia e mesma espécie. Este fato tem
28 sido relacionado ao uso de diferentes metodologias, levando à necessidade de
29 sistematização da metodologia imuno-histoquímica para COX-2, de modo a definir a
30 significância de sua expressão no prognóstico de neoplasias em cães (BELLUCO et al.,
31 2016).

32 Os estudos utilizando a imuno-histoquímica em HSA canino são
33 abrangentes, no entanto não foram encontradas informações sobre a relação da

1 expressão dos diferentes marcadores e a sobrevida dos cães, fato que poderia contribuir
2 para estabelecer fatores de prognóstico e novas terapias com base na expressão de
3 moléculas alvo.

4 Biomarcadores séricos possuem grande vantagem por demandarem
5 técnica pouco invasiva. Um estudo com microRNAs: microRNA-214 e microRNA-126,
6 pequenos RNAs não codificantes secretados por células neoplásicas em microvesículas
7 na corrente sanguínea, demonstrou ser um potencial biomarcador sérico em cães com
8 HSA esplênico (HEISHIMA et al., 2015).

9

10 2.6 TRATAMENTO

11

12 Na oncologia veterinária o tratamento dos HSA há muitos anos
13 representa um desafio; muitas terapias foram realizadas, porém nenhuma apresenta
14 perspectiva de controle efetivo da doença (FINOTELLO et al., 2016).

15 A excisão cirúrgica é o tratamento de escolha para controle local do
16 HSA cutâneo. Quando há envolvimento da derme margens de 2 cm são suficientes,
17 porém nos casos em que há envolvimento muscular geralmente a excisão completa do
18 tumor não é possível (THAMM, 2013). Embora a intervenção cirúrgica seja o
19 tratamento primário dessa neoplasia, terapias adjuvantes vêm sendo estudadas devido à
20 recidiva frequente e sobrevida curta de muitos cães com HSA cutâneo tratados apenas
21 com essa modalidade.

22 A quimioterapia vem sendo amplamente utilizada no tratamento de
23 cães com HSA, no entanto apresenta sucesso limitado no controle da doença. O
24 protocolo quimioterápico mais utilizado é a administração de doxorubicina (30mg/m²,
25 via intravenosa) que associado ao tratamento cirúrgico apresenta moderado acréscimo
26 no tempo de sobrevida dos cães (SORENMO; JEG LUM; HELFAND, 1993;
27 CLIFFORD et al., 2001; BULAKOWSKI et al., 2008; THAMM, 2013). Outros
28 quimioterápicos como a ciclofosfamida, a vincristina e o metotrexato também podem
29 ser utilizados em associações (THAMM, 2013). Bulakowski et al. (2008) avaliaram a
30 resposta da doxorubicina como tratamento adjuvante em HSA subcutâneos e
31 intramusculares de cães e concluíram que é consistentemente melhor nos tumores
32 subcutâneos.

1 Uma modalidade de quimioterapia que utiliza baixas doses e
2 administração frequente, denominada metronômica, demonstrou ser eficaz em HSA
3 esplênico canino utilizando a combinação de ciclofosfamida, etoposido e piroxicam (via
4 oral). Nesse tipo de tratamento o tempo de sobrevida dos cães aumentou em 45 dias
5 comparado ao grupo tratado apenas com doxorrubicina, além de uma redução
6 substancial dos efeitos adversos devido à baixa toxicidade da quimioterapia
7 metronômica (LANA et al., 2007).

8 Um estudo mais recente com tratamento adjuvante de HSA
9 biologicamente agressivo, visceral e não visceral, associou a quimioterapia
10 convencional e a metronômica com ciclofosfamida, um anti-inflamatório não esteroidal
11 e a talidomida (um importante inibidor da angiogênese), e os resultados foram retardo
12 no tempo de metástase e aumento da sobrevida dos cães (FINOTELLO et al., 2016). A
13 eletroquimioterapia também foi utilizada em HSA, com cisplatina, e apresentou redução
14 de mais de 50% do volume do tumor (TOZON et al., 2001).

15 A radioterapia é uma opção terapêutica para controle local de HSA
16 cutâneos em cães (THAMM, 2013). Foi avaliada à resposta a radiação ionizante em
17 HSA não esplênicos, que revelou remissão parcial em 75% dos tumores e 20% de
18 remissão total, portanto demonstrou ser uma possibilidade terapêutica eficiente
19 (HILLERS et al., 2007).

20 Outros dois estudos avaliaram a associação de quimioterapia e
21 imunoterapia em HSA esplênico em cães após a excisão cirúrgica, utilizando uma
22 vacina obtida através de células de HSA canino alogênicas lisadas e muramil-
23 fosfatidiletanolamina encapsulado em lipossomo. Em ambos os estudos foram
24 observados efeitos imunomoduladores e aumento no tempo de sobrevida dos cães em 49
25 (U'REN et al., 2007) e 134 dias (VAIL et al., 1995).

26 Estudos comprovaram a eficácia de novas terapias baseadas na
27 inibição de moléculas alvos, relacionadas com a progressão tumoral de HSA em cães e
28 camundongos. Os principais alvos foram os fatores angiogênicos, com a utilização de
29 inibidores de tirosina quinase de VEGF testados *in vivo* (GINGRICH et al., 2003), o
30 composto sintético quimiopreventivo Oltipraz utilizado *in vitro* e *in vivo* (RUGGERI et
31 al., 2002) e o extrato vegetal honokiol estudado *in vitro* e *in vivo* (BAI et al., 2003), e
32 todos apresentaram efeitos terapêuticos em HSA.

1 A ação dos antiinflamatórios mavacoxib e carprofeno foi avaliada em
2 cultura de células de osteossarcoma, glioma, linfoma, mastocitoma e HSA de cães e foi
3 constatada inibição da proliferação celular e indução da apoptose das células
4 neoplásicas (PANG et al., 2014), fato que contribui para a hipótese de que a COX-2 tem
5 um importante papel na progressão neoplásica do HSA.

6 Outro alvo de estudo foi a endotelina, relacionada à proliferação
7 celular, inibição da apoptose e metástase de células neoplásicas, e que apresentou níveis
8 séricos aumentados em cães com HSA esplênico (FUKUMOTO et al., 2015). Em um
9 estudo *in vitro* com fármacos antagonistas de receptores de endotelina observou-se a
10 inibição do crescimento de linhagens de células de HSA canino (FUKUMOTO et al.,
11 2016). Ainda, esse mesmo tipo de células quando expostas a um extrato vegetal *Yunnan*
12 *Baiyao* apresentaram um aumento da apoptose que foi dose e tempo-dependente
13 (WIRTH et al., 2016). Os dados da literatura indicam que novos protocolos terapêuticos
14 têm sido desenvolvidos, porém ainda apresentam perspectivas de controle limitado da
15 doença.

16 2.7 PROGNÓSTICO

17 O prognóstico de cães com HSA na pele é reservado (FERNANDES,
18 2008). Apenas dois estudos avaliaram o tempo de sobrevivência de cães com HSA
19 cutâneo, submetidos a diferentes tratamentos. A mediana do tempo de sobrevida variou
20 entre 441 dias (WARD et al., 1994) e 987 dias (SZIVEK et al., 2012). Muitos outros
21 estudos relatam a sobrevivência de cães com HSA, no entanto não fazem distinção
22 quanto à localização cutânea ou visceral.

23 Os fatores prognósticos mais bem estabelecidos em cães com esta
24 neoplasia são invasão tecidual (gradação) e tamanho tumoral, e estão relacionados ao
25 maior sucesso cirúrgico e melhor prognóstico (WARD et al., 1994, SCHULTHEISS,
26 2004). Além disso, os cães com HSA cutâneo induzido pela luz solar apresentam maior
27 sobrevida, porém recorrência frequente, em comparação com os não induzidos pela
28 radiação solar (SZIVEK et al., 2012).

29
30
31
32
33

2.8 CONCLUSÃO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

O HSA cutâneo canino representa uma doença de grande importância na oncologia veterinária, sendo que sua ocorrência pode estar relacionada a um quadro neoplásico multicêntrico. A provável associação com a exposição à radiação solar, o comportamento biológico agressivo e os protocolos terapêuticos que não apresentam um controle efetivo da doença reforçam a necessidade de ampliação de investigações que auxiliem na compreensão do desenvolvimento da neoplasia. Estudos relacionados a biomarcadores, potenciais alvos terapêuticos e ensaios clínicos devem ser estimulados de modo a prolongar substancialmente a sobrevivência de cães com HSA cutâneo.

1 **REFERÊNCIAS**

2

3 ADACHI, M.; HOSHINO, Y.; IZUMI, Y.; SAKAI, H.; TAKAGI, S. Effects of
4 inhibitors of vascular endothelial growth factor receptor 2 and downstream pathways of
5 receptor tyrosine kinases involving phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target
6 of rapamycin or mitogen-activated protein kinase in canine hemangiosarcoma cell lines.
7 **Can J Vet Res**, v. 80, n. 3, p. 209-216, 2016a.

8 ADACHI, M.; HOSHINO, Y.; IZUMI, Y.; TAKAGI, S. Immunohistochemical
9 detection of a potential molecular therapeutic target for canine hemangiosarcoma. **J Vet**
10 **Med Sci**, v. 78, n. 4, p. 649-656, 2016b.

11 BAI, X.; CERIMELE, F.; USHIO-FUKAI, M.; WAQAS, M.; CAMPBELL, P.M.;
12 GOVINDARAJAN, B.; DER, C.J.; BATTLE, T.; FRANK, D.A.; YE, K.; MURAD,
13 E.; DUBIEL, W.; SOFF, G.; ARBISER, J.L. Honokiol, a small molecular weight
14 natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo. **J Biol Chem**,
15 v. 278, n. 37, p. 35501-35507, 2003.

16 BELLUCO, S.; CARNIER, P.; CASTAGNARO, M.; CHIERS, K.; MILLANTA, F.;
17 PENA, L.; PIRES, I.; QUEIROGA, F.; RIFFARD, S.; SCASE, T.; POLTON, G.
18 Immunohistochemical Labelling for Cyclo-oxygenase-2: Does the Positive Control
19 Guarantee Standardized Results? **J Comp Pathol**, v. 154, n. 2-3, p. 186-194, 2016.

20 BERTAZZOLO, W.; DELL'ORCO, M.; BONFANTI, U.; GHISLENI, G.;
21 CANIATTI, M.; MASSERDOTTI, C.; ANTONIAZZI, E.; CRIPPA, L.;
22 ROCCABIANCA, P. Canine angiosarcoma: cytologic, histologic, and
23 immunohistochemical correlations. **Vet Clin Pathol**, v. 34, n. 1, p. 28-34, 2005.

24 BRENN, T.; FLETCHER, C.D. Radiation-associated cutaneous atypical vascular
25 lesions and angiosarcoma: clinicopathologic analysis of 42 cases. **Am J Surg Pathol**, v.
26 29, n. 8, p. 983-996, 2005.

27 BROWN, N.O.; PATNAIK, A.K.; MACEWEN, E.G. Canine hemangiosarcoma:
28 retrospective analysis of 104 cases. **J Am Vet Med Assoc**, v. 186, n. 1, p. 56-58, 1985.

29 BULAKOWSKI, E.J.; PHILIBERT, J.C.; SIEGEL, S.; CLIFFORD, C.A.; RISBON,
30 R.; ZIVIN, K.; CRONIN, K.L. Evaluation of outcome associated with subcutaneous
31 and intramuscular hemangiosarcoma treated with adjuvant doxorubicin in dogs: 21
32 cases (2001-2006). **J Am Vet Med Assoc**, v. 233, n. 1, p. 122-128, 2008.

33 CAMPOS, A.G.; CAMPOS, J.A.D.B.; SANCHES, D.S.; DAGLI, M.L.Z.; MATERA,
34 J.M. Immunohistochemical Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
35 in Splenic Hemangiomas and Hemangiosarcomas in Dogs. **Open J Vet Med**, v. 2, n. 4,
36 p. 191-195, 2012.

37 CAPPELLO, F.; RIBBENE, A.; CAMPANELLA, C.; CZARNECKA, A.M.;
38 ANZALONE, R.; BUCCHIERI, F.; PALMA, A.; ZUMMO, G. The value of
39 immunohistochemical research on PCNA, p53 and heat shock proteins in prostate
40 cancer management: a review. **Eur J Histochem**, v. 50, n. 1, p. 25-34, 2006.

- 1 CHANDLER, H.L.; NEWKIRK, K.M.; KUSEWITT, D.F.; DUBIELZIG, R.R.;
2 COLITZ, C.M. Immunohistochemical analysis of ocular hemangiomas and
3 hemangiosarcomas in dogs. **Vet Ophthalmol**, v. 12, n. 2, p. 83-90, 2009.
- 4 CHEN, Y.C.; LIAO, J.W.; HSU, W.L.; CHANG, S.C. Identification of the two KIT
5 isoforms and their expression status in canine hemangiosarcomas. **BMC Vet Res**, v. 12,
6 n. 1, p. 142, 2016.
- 7 CLIFFORD, C.A.; HUGHES, D.; BEAL, M.W.; MACKIN, A.J.; HENRY, C.J.;
8 SHOFER, F.S.; SORENMO, K.U. Plasma vascular endothelial growth factor
9 concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. **J Vet Intern Med**, v.
10 15, n. 2, p. 131-135, 2001.
- 11 DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; SCHMOLL, H.J. Cyclooxygenase-2: a novel
12 target for cancer chemotherapy? **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 127, n. 7, p. 411-417,
13 2001.
- 14 FERNANDES, S.C.; De Nardi, A.B. Hemangiosarcoma. In: Daleck, C.R, de Nardi,
15 A.B. Oncologia em Cães e Gatos. 1. ed. São Paulo: ROCA, 2008. p.612.
- 16 FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor.
17 **Endocr Rev**, v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.
- 18 FERRER, L.; FONDEVILA, D.; RABANAL, R.M.; VILAFRANCA, M.
19 Immunohistochemical detection of CD31 antigen in normal and neoplastic canine
20 endothelial cells. **J Comp Pathol**, v. 112, n. 4, p. 319-326, 1995.
- 21 FINOTELLO, R.; HENRIQUES, J.; SABATTINI, S.; STEFANELLO, D.;
22 FELISBERTO, R.; PIZZONI, S.; FERRARI, R.; MARCONATO, L. A retrospective
23 analysis of chemotherapy switch suggests improved outcome in surgically removed,
24 biologically aggressive canine haemangiosarcoma. **Vet Comp Oncol**, v. 15, p. 493-503,
25 2016.
- 26 FOSSLIEN, E. Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced
27 angiogenesis. **Ann Clin Lab Sci**, v. 31, n. 4, p. 325-348, 2001.
- 28 FUKUMOTO, S.; MIYASHO, T.; HANAZONO, K.; SAIDA, K.; KADOSAWA, T.;
29 IWANO, H.; UCHIDE, T. Big endothelin-1 as a tumour marker for canine
30 haemangiosarcoma. **Vet J**, v. 204, n. 3, p. 269-274, 2015.
- 31 FUKUMOTO, S.; SAIDA, K.; SAKAI, H.; UENO, H.; IWANO, H.; UCHIDE, T.
32 Therapeutic potential of endothelin inhibitors in canine hemangiosarcoma. **Life Sci**, v.
33 159, p. 55-60, 2016.
- 34 GINGRICH, D.E.; REDDY, D.R.; IQBAL, M.A.; SINGH, J.; AIMONE, L.D.;
35 ANGELES, T.S.; ALBOM, M.; YANG, S.; ATOR, M.A.; MEYER, S.L.;
36 ROBINSON, C.; RUGGERI, B.A.; DIONNE, C.A.; VAUGHT, J.L.; MALLAMO,
37 J.P.; HUDKINS, R.L. A new class of potent vascular endothelial growth factor receptor
38 tyrosine kinase inhibitors: structure-activity relationships for a series of 9-
39 alkoxymethyl-12-(3-hydroxypropyl)indeno[2,1-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5-ones and
40 the identification of CEP-5214 and its dimethylglycine ester prodrug clinical candidate
41 CEP-7055. **J Med Chem**, v. 46, n. 25, p. 5375-5388, 2003.

- 1 GROSS, T.L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Vascular Tumors. In:
2 Skin Diseases of the Dog and Cat. LOCAL:Blackwell Science Ltd, 2008. p.735-758.
- 3 HARGIS, A.M.; IHRKE, P.J.; SPANGLER, W.L.; STANNARD, A.A. A retrospective
4 clinicopathologic study of 212 dogs with cutaneous hemangiomas and
5 hemangiosarcomas. **Vet Pathol**, v. 29, n. 4, p. 316-328, 1992.
- 6 HEISHIMA, K.; MORI, T.; ICHIKAWA, Y.; SAKAI, H.; KURANAGA, Y.;
7 NAKAGAWA, T.; TANAKA, Y.; OKAMURA, Y.; MASUZAWA, M.; SUGITO,
8 N.; MURAKAMI, M.; YAMADA, N.; AKAO, Y.; MARUO, K. MicroRNA-214 and
9 MicroRNA-126 Are Potential Biomarkers for Malignant Endothelial Proliferative
10 Diseases. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 10, p. 25377-25391, 2015.
- 11 HELLER, D.A.; CLIFFORD, C.A.; GOLDSCHMIDT, M.H.; HOLT, D.E.;
12 MANFREDI, M.J.; SORENMO, K.U. Assessment of cyclooxygenase-2 expression in
13 canine hemangiosarcoma, histiocytic sarcoma, and mast cell tumor. **Vet Pathol**, v. 42,
14 n. 3, p. 350-353, 2005.
- 15 HENDRICK, M.J. Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUTEN,
16 D.J. Tumors in Domestic Animals, Ames, : John Wiley & Sons, 2016, pp. 142-175.
- 17 HILLERS, K.R.; LANA, S.E.; FULLER, C.R.; LARUE, S.M. Effects of palliative
18 radiation therapy on nonsplenic hemangiosarcoma in dogs. **J Am Anim Hosp Assoc**, v.
19 43, n. 4, p. 187-192, 2007.
- 20 HU, Z.; YANG, Y.; ZHAO, Y.; HUANG, Y. The prognostic value of cyclooxygenase-
21 2 expression in patients with esophageal cancer: evidence from a meta-analysis. **Oncol
22 Targets Ther**, v. 10, p. 2893-2901, 2017.
- 23 HUANG, W.W.; HSIEH, K.P.; HUANG, R.Y.; YANG, Y.H. Role of cyclooxygenase-
24 2 inhibitors in the survival outcome of colorectal cancer patients: A population-based
25 cohort study. **Kaohsiung J Med Sci**, v. 33, n. 6, p. 308-314, 2017.
- 26 KODAMA, A.; SAKAI, H.; MATSUURA, S.; MURAKAMI, M.; MURAI, A.;
27 MORI, T.; MARUO, K.; KIMURA, T.; MASEGI, T.; YANAI, T. Establishment of
28 canine hemangiosarcoma xenograft models expressing endothelial growth factors, their
29 receptors, and angiogenesis-associated homeobox genes. **BMC Cancer**, v. 9, p. 363,
30 2009.
- 31 KURTOVA, A.V.; XIAO, J.; MO, Q.; PAZHANISAMY, S.; KRASNOW, R.;
32 LERNER, S.P.; CHEN, F.; ROH, T.T.; LAY, E.; HO, P.L.; CHAN, K.S. Blocking
33 PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. **Nature**,
34 v. 517, n. 7533, p. 209-213, 2015.
- 35 LANA, S.; U'REN, L.; PLAZA, S.; ELMSLIE, R.; GUSTAFSON, D.; MORLEY,
36 P.; DOW, S. Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic
37 hemangiosarcoma in dogs. **J Vet Intern Med**, v. 21, n. 4, p. 764-769, 2007.
- 38 MIETTINEN, M.; SARLOMO-RIKALA, M.; LASOTA, J. KIT expression in
39 angiosarcomas and fetal endothelial cells: lack of mutations of exon 11 and exon 17 of
40 C-kit. **Mod Pathol**, v. 13, n. 5, p. 536-541, 2000.

- 1 NIKULA, K.J.; BENJAMIN, S.A.; ANGLETON, G.M.; SAUNDERS, W.J.; LEE,
2 A.C. Ultraviolet radiation, solar dermatosis, and cutaneous neoplasia in beagle dogs.
3 **Radiat Res**, v. 129, n. 1, p. 11-18, 1992.
- 4 PANG, L.Y.; ARGYLE, S.A.; KAMIDA, A.; MORRISON, K.O.; ARGYLE, D.J.
5 The long-acting COX-2 inhibitor mavacoxib (Trocoxil) has anti-proliferative and pro-
6 apoptotic effects on canine cancer cell lines and cancer stem cells in vitro. **BMC Vet**
7 **Res**, v. 10, p. 184, 2014.
- 8 RAMOS-VARA, J.A.; MILLER, M.A.; DUSOLD, D.M. Immunohistochemical
9 expression of CD31 (PECAM-1) in nonendothelial tumors of dogs. **Vet Pathol**, v. 55,
10 n. 3, p. 402-408, 2018.
- 11 RUGGERI, B.A.; ROBINSON, C.; ANGELES, T.; WILKINSON, J.T.; CLAPPER,
12 M.L. The chemopreventive agent oltipraz possesses potent antiangiogenic activity in
13 vitro, ex vivo, and in vivo and inhibits tumor xenograft growth. **Clin Cancer Res**, v. 8,
14 n. 1, p. 267-274, 2002.
- 15 SABATTINI, S.; BETTINI, G. An immunohistochemical analysis of canine
16 haemangioma and haemangiosarcoma. **J Comp Pathol**, v. 140, n. 2-3, p. 158-168,
17 2009.
- 18 SCHULTHEISS, P.C. A retrospective study of visceral and nonvisceral
19 hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. **J Vet Diagn Invest**, v. 16, n.
20 6, p. 522-526, 2004.
- 21 SHIU, K.B.; FLORY, A.B.; ANDERSON, C.L.; WYPIJ, J.; SABA, C.; WILSON, H.;
22 KURZMAN, I.; CHUN, R. Predictors of outcome in dogs with subcutaneous or
23 intramuscular hemangiosarcoma. **J Am Vet Med Assoc**, v. 238, n. 4, p. 472-479, 2011.
- 24 SMITH, A.N. Hemangiosarcoma in dogs and cats. **Vet Clin North Am Small Anim**
25 **Pract**, v. 33, n. 3, p. 533-552, vi, 2003.
- 26 SORENMO, K.U.; JEGLUM, K.A.; HELFAND, S.C. Chemotherapy of canine
27 hemangiosarcoma with doxorubicin and cyclophosphamide. **J Vet Intern Med**, v. 7, n.
28 6, p. 370-376, 1993.
- 29 SZIVEK, A.; BURNS, R.E.; GERICOTA, B.; AFFOLTER, V.K.; KENT, M.S.;
30 RODRIGUEZ, C.O., JR.; SKORUPSKI, K.A. Clinical outcome in 94 cases of dermal
31 haemangiosarcoma in dogs treated with surgical excision: 1993-2007*. **Vet Comp**
32 **Oncol**, v. 10, n. 1, p. 65-73, 2012.
- 33 TAKETO, M.M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). **J Natl Cancer**
34 **Inst**, v. 90, n. 20, p. 1529-1536, 1998.
- 35 THAMM, D.H. Miscellaneous Tumors. In: VAIL, D.M. e PAGE, R.L. (Ed.). *Withrow*
36 *and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fifth Edition)*. Saint Louis: W.B.
37 Saunders, 2013, p.679-715.
- 38 TOZON, N.; SERSA, G.; CEMAZAR, M. Electrochemotherapy: Potentiation of local
39 antitumour effectiveness of cisplatin in dogs and cats. **Anticancer Res**, v. 21, n. 4A, p.
40 2483-2488, 2001.

- 1 U'REN, L.W.; BILLER, B.J.; ELMSLIE, R.E.; THAMM, D.H.; DOW, S.W. Evaluation
2 of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma. **J Vet Int Med**, v. 21, n. 1, p.
3 113-120, 2007.
- 4 VAIL, D.M.; MACEWEN, E.G.; KURZMAN, I.D.; DUBIELZIG, R.R.; HELFAND,
5 S.C.; KISSEBERTH, W.C.; LONDON, C.A.; OBRADOVICH, J.E.; MADEWELL,
6 B.R.; RODRIGUEZ, C.O. JR. Liposome-encapsulated muramyl tripeptide
7 phosphatidylethanolamine adjuvant immunotherapy for splenic hemangiosarcoma in the
8 dog: a randomized multi-institutional clinical trial. **Clin Cancer Res**, v. 1, n. 10, p.
9 1165-1170, 1995.
- 10 VON BEUST, B.R.; SUTER, M.M.; SUMMERS, B.A. Factor VIII-related antigen in
11 canine endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. **Vet Pathol**, v. 25, n. 4,
12 p. 251-255, 1988.
- 13 WANG, G.; WU, M.; MALONEYHUSS, M.A.; WOJCIK, J.; DURHAM, A.C.;
14 MASON, N.J.; ROTH, D.B. Actionable mutations in canine hemangiosarcoma. **PLoS**
15 **ONE**, v. 12, n.11, p. e0188667, 2017.
- 16 WARD, H.; FOX, L.E.; CALDERWOOD-MAYS, M.B.; HAMMER, A.S.; COUTO,
17 C.G. Cutaneous hemangiosarcoma in 25 dogs: a retrospective study. **J Vet Intern Med**,
18 v. 8, n. 5, p. 345-348, 1994.
- 19 WARREN, A.L.; SUMMERS, B.A. Epithelioid variant of hemangioma and
20 hemangiosarcoma in the dog, horse, and cow. **Vet Pathol**, v. 44, n. 1, p. 15-24, 2007.
- 21 WIRTH, K.A.; KOW, K.; SALUTE, M.E.; BACON, N.J.; MILNER, R.J. In vitro
22 effects of Yunnan Baiyao on canine hemangiosarcoma cell lines. **Vet Comp Oncol**, v.
23 14, n. 3, p. 281-294, 2016.
- 24 YONEMARU, K.; SAKAI, H.; MURAKAMI, M.; YANAI, T.; MASEGI, T.
25 Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and
26 their receptors (flt-1, flk-1, and flg-1) in canine vascular tumors. **Vet Pathol**, v. 43, n. 6,
27 p. 971-980, 2006.
- 28
29

1 **3 OBJETIVOS**

2

3 **3.1 OBJETIVO GERAL**

4

5 Avaliar a expressão IHQ de diferentes proteínas no HSA cutâneo
6 canino a fim de determinar biomarcadores de prognóstico.

7

8 **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

9

10 Definir os fatores epidemiológicos e anatomopatológicas dos
11 hemangiossarcomas cutâneos em cães.

12 Avaliar a expressão das proteínas fator VIII, COX-2, VEGF, PCNA e
13 Caspase-3 dos hemangiossarcomas cutâneos caninos, por meio de exame imuno-
14 histoquímico.

15 Estabelecer a relação da expressão das proteínas de interesse, idade,
16 sexo, raça, graduação, escore de diferenciação histológica e tamanho dos tumores com o
17 tempo de sobrevida dos cães com hemangiossarcoma cutâneo.

18

1 **4 ARTIGO**

2

3 **Canine Cutaneous Hemangiosarcoma: Biomarkers and Survival**

4

5 D.F. Nóbrega*, V.F. Sehaber†, R. Madureira*, A.P.F.R.L. Bracarense*

6

7 *Laboratory of Animal Pathology, Department of Veterinary Preventive Medicine,
8 Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380,
9 Campus Universitário, PO Box 10.011, 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil

10 †Universidade Federal do Paraná Curitiba, Centro Politécnico, Av. Cel. Francisco H. dos
11 Santos, 210, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil

12

13 Corresponding author: Dr. Ana Paula F. R. L. Bracarense, Phone/Fax: + 55 413371-
14 4766. E-mail: anapaula@uel.br

15

Summary

1
2
3 Hemangiosarcoma (HSA) is a malignant neoplasm of vascular endothelial cells that are
4 common in dogs, rare in other species and may arise in any tissue. Dermal locations of
5 canine HSA was generally associated with short survival and recurrence after surgical
6 excision is frequent. Solar radiation has been proposed as a predisposing factor for
7 occurring in short hair dogs with lightly pigmented skin. Studies were not located in the
8 literature relating immunohistochemical (IHC) expression of markers and survival of
9 dogs with cutaneous HSA. These data could contribute to establish prognostic factors
10 and new therapies based on the expression of target molecules. The aim of this study
11 was to evaluate biomarkers and overall survival (OS) of dogs with cutaneous HSA, to
12 understand the biological behavior of this neoplasm and determine prognostic factors.
13 Were evaluated the expression of factor VIII (fVIII), cyclooxygenase-2 (COX-2),
14 vascular endothelial growth factor (VEGF), proliferation cell nuclear antigen (PCNA)
15 e caspase-3 (Casp-3) by immunohistochemistry in 60 samples of canine cutaneous
16 HSA, and related to OS of the animals through the analysis of survival, in the model of
17 competitive risks. In addition, were verified the relation of age, sex, breed, tumour
18 grade, score of histological differentiation, mitotic rate and tumour size with OS of the
19 dogs. The expression of the markers was positive in 80 to 100% of the samples,
20 predominantly with weak to moderate labeling intensity in fVIII, COX-2 and VEGF and
21 exclusively strong in PCNA and Casp-3. The median OS of the dogs was 12 months.
22 The age of the dogs, tumour grade, score of histological differentiation, mitotic rate and
23 size of tumours were not related to survival. There was a tendency of dogs of
24 predisposed breeds (Pit bull, Boxer, Basset Hound e Dalmatian) to have greater OS,
25 compared to dogs of not predisposed breeds. The dogs that had other concomitant

1 primary neoplasms had a longer survival curve than dogs that had only HSA and the
2 female dogs of the group with other neoplasms presented lower OS. The labelling index
3 of fVIII, COX-2, VEGF, PCNA and Casp-3 had no relation to OS, as well as the
4 labelling intensity of fVIII, COX-2 and VEGF. However, expression of COX-2 and
5 VEGF is frequent in canine cHSA and these molecules are possible therapeutic targets
6 to be investigated.

7

8 *Keywords:* dog; immunohistochemical; malignant vascular tumour; prognosis

Introduction

Hemangiosarcoma (HSA) is a malignant neoplasm of vascular endothelial cells that is common in dogs, rare in other species and may arise in any vascularized tissue (Brown *et al.*, 1985; Smith, 2003). The organs most affected in dogs are the spleen, right atrium, skin and liver (Fernandes, 2008). This neoplasm can be primarily cutaneous with subcutaneous and muscular infiltration or primarily subcutaneous with intramuscular involvement (Shiu *et al.*, 2011; Ward *et al.*, 1994). Dermal location of canine HSA was generally associated with short survival (Schultheiss, 2004; Shiu *et al.*, 2011) and recurrence after surgical excision is frequent (Hargis *et al.*, 1992).

Solar radiation has been proposed as a predisposing factor for occurring in short hair dogs with lightly pigmented skin (Hargis *et al.*, 1992; Nikula *et al.*, 1992). In addition, mutation of *PTEN* gene and retinoblastoma protein pathways overexpression has been reported in canine HSA (visceral and not visceral), and are probably associated with the pathogenesis of this neoplasm (Dickerson *et al.*, 2005; Yonemaru *et al.*, 2007). The predisposed breeds to cutaneous hemangiosarcoma (cHSA) are Whippet, Italian Greyhound, Beagle, Dalmatian, American Staffordshire Terrier/Pit Bull, Boxer and Basset Hound (Hargis *et al.*, 1992; Szivek *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 1994). Actinic lesions and hemangioma (HA) may precede the malignant form for a long time (Hargis *et al.*, 1992). The regions most affected of the skin are ventral abdominal, preputial and pelvic limbs (Fernandes, 2008; Hargis *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1994). A previous study reported that 60% of dogs with HSA involving the skin and subcutaneous tissue presented the same neoplasia in other organs (Hargis *et al.*, 1992).

One of the main areas of interest in oncology studies is survival time and factors involved. Data regarding survival time in canine HSA are available, however, most studies

1 are of subcutaneous, intramuscular or visceral tumours (Bulakowski *et al.*, 2008; Goritz *et al.*,
2 2013; Shiu *et al.*, 2011; Sorenmo *et al.*, 2004). The median survival time in dogs presenting
3 cHSA submitted to different treatments varied from 172 – 780 days, according to the staging
4 (Ward *et al.*, 1994) and 987 days (Szivek *et al.*, 2012). A longer survival was proposed for
5 dogs presenting the solar-induced form of the cHSA compared to non-solar-induced form
6 (Szivek *et al.*, 2012). Nevertheless, no difference in the clinical outcome was observed in
7 other investigation (Schultheiss, 2004).

8 Several studies have related the expression of immunohistochemical (IHC) markers as
9 useful prognostic factors in varied neoplasms in dogs. The most used biomarkers are
10 cyclooxygenase-2 (COX-2) (Carvalho *et al.*, 2017; Dore, 2011; Gregorio *et al.*, 2017), Ki-67
11 (Fonseca-Alves *et al.*, 2015; Gregorio *et al.*, 2017; Vascellari *et al.*, 2013) and vascular
12 endothelial growth factor (VEGF) or its receptors (Da Silva and Fonseca-Alves, 2017; Platt *et*
13 *al.*, 2006).

14 Regarding canine HSA, previous studies have described IHC expression mainly of
15 factor VIII/von Willebrand (fVIII) (Giuffrida *et al.*, 2017; Sabattini and Bettini, 2009; von
16 Beust *et al.*, 1988), CD31 (Ferrer *et al.*, 1995), CD117 (c-kit) (Chen *et al.*, 2016; Fosmire *et*
17 *al.*, 2004; Sabattini and Bettini, 2009), COX-2 (Heller *et al.*, 2005), proliferating cell nuclear
18 antigen (PCNA) (Chandler *et al.*, 2009), VEGF, basic fibroblastic growth factor (bFGF) and
19 its receptors (Sabattini and Bettini, 2009; Yonemaru *et al.*, 2006), bcl-2, survivin (Murakami
20 *et al.*, 2008), Akt/mTOR/4E-BP1 pathway (Murai *et al.*, 2012) and peroxiredoxin 6 (Anwar *et*
21 *al.*, 2016). However, no data was found in the available scientific database relating IHC
22 expression of markers and survival of dogs diagnosed with cHSA. These data could
23 contribute to establish prognostic factors and new therapies based on the expression of target
24 molecules; additionally it helps to understand the pathogenesis of this neoplasm in dogs and
25 comparatively in humans.

1 In this way, the aims of this study were to evaluate the epidemiological,
2 histopathological and IHC data of cHSA and to relate with OS of the dogs, to determine
3 prognostic biomarkers.

4 **Materials and Methods**

7 *Animals*

8 A retrospective study was performed using samples of canine cHSA diagnosed at a
9 Veterinary Teaching School Hospital, Universidade Estadual de Londrina, southern Brazil,
10 from January 2004 to December 2016. Criteria for inclusion of cases were histopathological
11 diagnosis of cHSA and data regarding survival time. All animals were submitted to surgical
12 excision of the tumour.

13 The time interval between the histopathological diagnosis of cHSA and the death of
14 dogs or the end of the study was determined as the overall survival (OS). Due to the
15 established period of this study, not all dogs could be followed-up until the death; because of
16 this, the observational trial time of these dogs was considered as censure. Epidemiological
17 data such as age, breed and sex were also evaluated.

19 *Macroscopic and histopathological analysis*

20 Data regarding the macroscopic analysis of the tumours were collected, such as size,
21 anatomic location and presence of other neoplasms. When the animal had more than one
22 cHSA, the largest one was analyzed.

23 Samples were fixed in 10% buffered formalin solution, embedded in paraffin,
24 sectioned (4 μ m) and stained with hematoxylin and eosin (HE). All slides were re-evaluated
25 for tumour grade according to Ward *et al.* (1994). Briefly, the score was based on histological

1 invasiveness: dermal limited (stage I), hypodermal involvement (stage II) and muscular
2 infiltration (stage III). The samples were also scored for histological differentiation, linking
3 overall cellular differentiation and nuclear pleomorphism; score 1 represents well
4 differentiated lesions with many vascular channels and minimal nuclear size and shape
5 variation, score 2 has moderate differentiation and nuclear variation and score 3 represents a
6 poorly differentiated tumours, with few vascular channels and marked nuclear variation
7 (Sabattini and Bettini, 2009). The mitotic rate of tumours was also evaluated, counting
8 number of mitotic figures in 10 high-power (400X magnification) fields and were divided into
9 4 groups: 1 to 5, 6 to 10, 11 to 20 and more than 20 mitoses.

10

11 *Immunohistochemical analysis*

12 For IHC analysis, tissue sections were deparaffinized with xylene and dehydrated
13 through a graded ethanol series. Heat-mediated antigen retrieval was done by heating the
14 sections (immersed in EDTA buffer, pH 9.0 or Citrate buffer, pH 6.0) in a microwave oven
15 (750W) for 9 to 14 minutes. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in
16 methanol/ H₂O₂ solution. The sections were incubated overnight at 4°C with the primary
17 antibodies (Table 1). The secondary antibody (Kit Super Picture™ Zymed, San Francisco,
18 CA) was applied followed by the addition of the chromogen diaminobenzidine for four
19 minutes.

20 The tissue sections were counterstained with hematoxylin and mounted on coverslips
21 using a permanent mounting medium. Positive controls were used according to the
22 manufacturer instructions, for negative controls the same tissues had primary antibody
23 replaced with antibody diluent. For COX-2, the macula densa of canine kidney was used as
24 positive control (Belluco *et al.*, 2016). The tissue sections were examined to establish the
25 labeling index; 500 cells per slide were counted manually in random high-

1 power fields (400x), and the percentage of immunostained cells was determined. To
 2 determine the expression index of PCNA, only cells with strong labeling were counted. In
 3 addition, each sample was evaluated for the intensity of labelling, as weak, moderate or strong
 4 for fVIII, COX-2 and VEGF.

5

6 **Table 1. Primary antibodies used in immunohistochemistry**

<i>Primary antibody</i>	<i>Clone</i>	<i>Source</i>	<i>Dilution</i>
fVIII	polyclonal antibody	Invitrogen – Camarillo, CA	1 in 100
COX-2	CX-294	Dako – Carpinteria, CA	1 in 50
VEGF	VG-1	Santa Cruz Biotechnology – Santa Cruz, CA	1 in 50
PCNA	PC10	Zymed – South San Francisco, CA	1 in 200
Casp-3	Asp175	Cell Signaling Technology – Danvers, MA	1 in 200

7

8

9 *Statistical analysis*

10 The statistical analysis was based on a retrospective observational clinical trial of
 11 veterinary records of dogs presenting cHSA, which were followed up for six to 150 months
 12 post-diagnosis, between July 2004 and December 2016. The survival time of the followed up
 13 dogs with cHSA was competing with other diagnosed neoplasms, i. e. survival time of dogs
 14 would be influenced for the presence of other neoplasms. Therefore, the animals were
 15 grouped according to the competitive causes, being group 1 when they only had cHSA, and
 16 group 2 when the dogs had other neoplasms diagnosed besides HSA, concomitantly.

17 Therefore, to verify an association between the OS with breed, sex, tumour grade,
 18 histological score, mitotic rate and the intensity of IHC markers in the dogs, it was used a
 19 model of competitive risks of Fine-Gray (Fine and Gray, 1999) and the Gray's test (Gray,
 20 2014) based on cumulative incidence functions. For the age of dogs, tumours size, labelling
 21 index of markers and the above-mentioned variables a proportional subdistribution hazards
 22 regression model described by Fine and Gray (1999) was used, just to make sure that the all

1 kind of explanatory covariate information (discrete and continuous variables) would be used,
2 considering a significance level of 5%. The data was fitted using the library cmprsk (Gray,
3 2017) from software R, version 3.4.1 (R Core Team, 2017).

4

5

Results

6

Animals

7 In the period of the study 5,543 canine neoplasms were diagnosed, in which 1.98%
8 were cHSA. Survival information was obtained from 60 cases, which were analyzed, among
9 them 30 were from male dogs and 30 of females. The average age of the dogs was 8.5 years
10 (range 3-18 years). Mixed breed were most frequent (38.3%, n = 23), followed by Pit bull
11 (35%, n = 21), Boxer (8.3%, n = 5), Teckel (5%, n = 3) and other breeds (13.3%, n = 8).
12 Overall, 29/60 dogs (48.3%) were of predisposed breeds (Pit bull, Boxer, Basset Hound and
13 Dalmatian).

14

15

Macroscopic and histopathological analysis

16 The average diameter of the tumours was 2.5 cm, ranging from 0.25 to 14.5 cm. cHSA
17 occurred in inguinal region (50%, n = 30), abdominal (31.6%, n = 19), limbs (15%, n = 9),
18 head (8.3%, n = 5) and thorax (5%, n = 3). Almost half of the dogs (45%, n = 27) had others
19 HSA and/or HA on the skin, and of all 35% (n = 21) had multiple cHSA. From all the cases,
20 20/60 (33.3%) presented concomitantly other cutaneous, subcutaneous or mammary
21 neoplasms (not HSA); from these, nine (45%) were malignant.

22

23

24

Microscopically, HSA showed different degrees of nuclear differentiation and cellular
patterns, characterized by poorly demarcated proliferation of spindle shape to epithelioid
cells, aligned on trabeculae of collagen, forming irregular vascular channels blood-filled of

1 varying sizes (Figure 1A). The cells had minimal cytoplasm, enlarged hyperchromatic nuclei,
2 inconspicuous to evident nucleoli and 1 to 53 (average = 12) mitosis in 10 high-power fields.

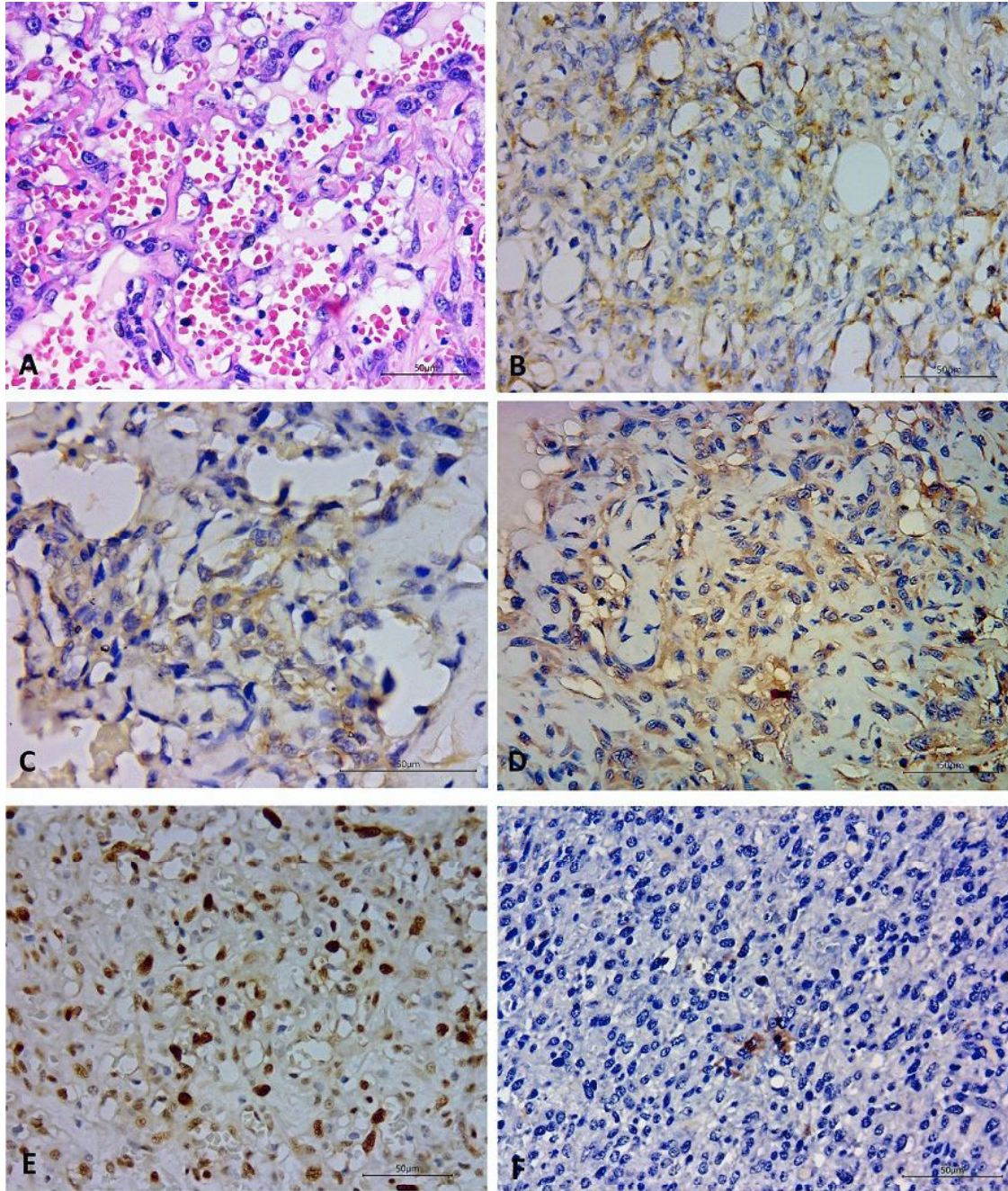
3 Concerning tumour grade, 41/60 (68.3%) were in stage I, 14/60 (23.3%) in stage II,
4 four (6.6%) in stage III and in one (1/60) case it was undetermined. Regarding the score of
5 histological differentiation of the tumours, 27/60 (45%) cases were score 2 (moderately
6 differentiated), 26/60 (43.3%) score 1 (well differentiated) and 6/60 (11.66%) were score 3
7 (poorly differentiated).

8

9 *Immunohistochemical analysis*

10 Immunohistochemical expression of fVIII, COX-2, VEGF, PCNA and Casp-3 were
11 evaluated according to the labelling index and intensity of immunolabelling in all the cHSA
12 of the present study. A summary of the immunolabelling in cHSA is shown in Table 2. The
13 fVIII exhibiting weak to strong cytoplasmic staining (Figure 1B). Expression of COX-2 was
14 weak or moderate intensity and cytoplasmic (Figure 1C). Immunodetection of VEGF
15 occurred in weak to strong cytoplasmic staining (Figure 1D). All samples had strong nuclear
16 staining of PCNA (Figure 1E) and strong cytoplasmic immunostaining for Casp-3 (Figure
17 1F).

18



1

2 Figure 1. Canine cHSA. (A) Proliferation of spindle shape aligned on delicate collagen
 3 trabeculae, forming irregular vascular channels blood-filled of varying sizes. HE. (B) fVIII
 4 immunoexpression, cytoplasmatic marking and weak intensity. IHC. (C) COX-2 expression,
 5 showing weak cytoplasmatic labelling. IHC. (D) VEGF immunoexpression, moderate
 6 cytoplasmatic labelling. IHC. (E) PCNA expression, strong nuclear immunostaining. IHC (F)
 7 Casp-3 labelling, showing cytoplasmatic labelling and strong intensity. IHC. Bars, 50 μm.

8

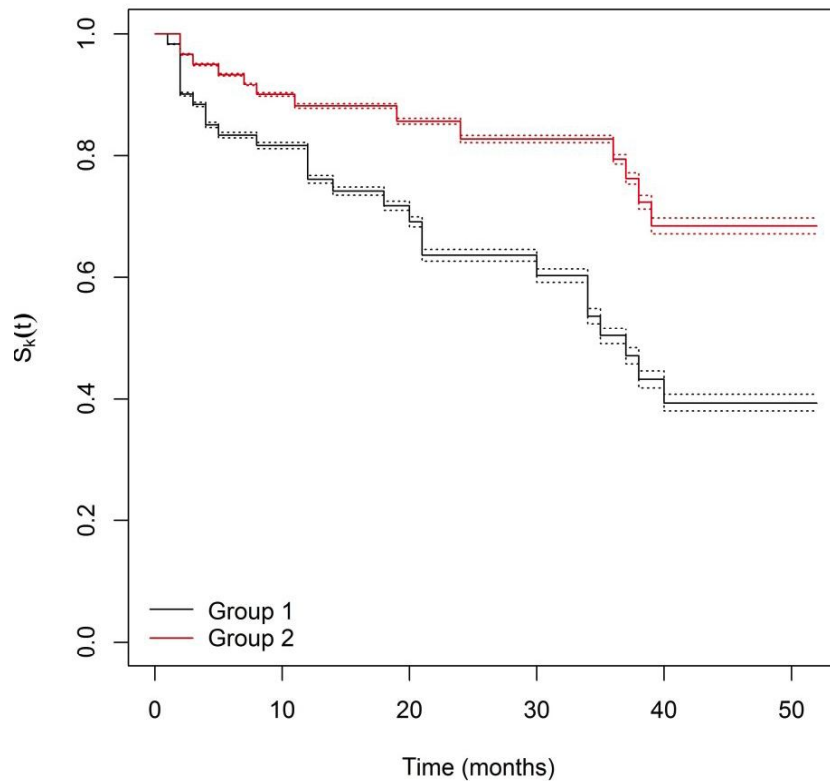
9

1 **Table 2. Summary of immunohistochemical labelling of canine cutaneous hemangiosarcoma (n = 60)**
 2

<i>Marker</i>	<i>Positive samples (%)</i>	<i>Average index of labelling (%)</i>	<i>Index range (%)</i>	<i>Intensity of labelling</i>		
				<i>weak (%)</i>	<i>moderate (%)</i>	<i>strong (%)</i>
fVIII	96.66 (58/60)	26.8	2.32 - 66	36.2	41.38	22.41
COX-2	80 (48/60)	24.3	0.67 - 86.66	95.83	4.17	0
VEGF	88.33 (53/60)	34.63	2.56 - 87	49.06	49.06	1.89
PCNA	100 (60/60)	31.6	5.14 - 77.55	0	0	100
Casp-3	86.66 (52/60)	9.7	0.05 - 73.93	0	0	100

3
 4 *Survival time*

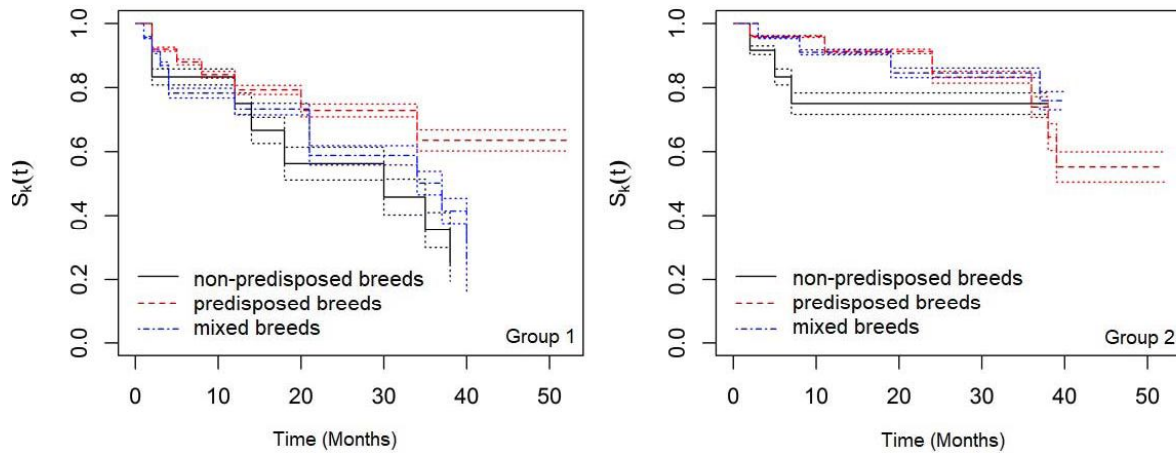
5 By the end of this study, 39 dogs died (25 of group 1 and 14 of group 2) and 21
 6 remained alive (15 of group 1 and 6 of group 2). The median OS was 12 months (365 days),
 7 and average was 16.5 months (495 days), ranging from 1 to 52 months, considering only the
 8 animals that reached the endpoint (death). Analyzing the survival curves of competitive
 9 causes, the dogs that had only HSA (group 1) had reduced survival compared to dogs with
 10 concomitantly other neoplasms (group 2) (Figure 2).



1
 2 Figure 2. Survival curves based on cumulative incidence functions from competing risks data
 3 (Gray, 2014), the black and red survival curves represent the groups of dogs that had only
 4 HSA (group 1) and with concomitantly other neoplasms (group 2), respectively.
 5

6 The following variables: age, breed, sex, size of tumours, tumour grade, score of
 7 histological differentiation, mitotic rate, labelling index and intensity of immunostaining were
 8 compared with the OS, considering the competitive causes.

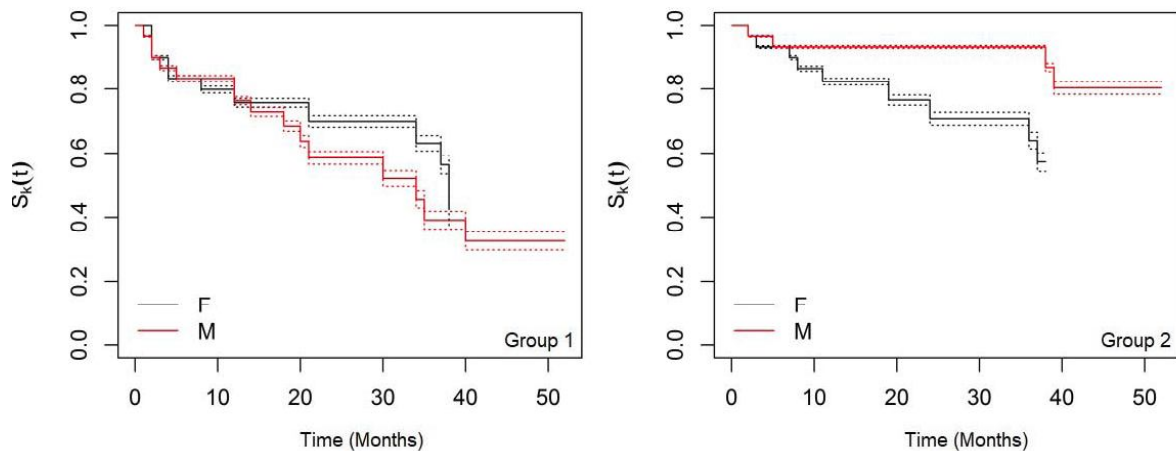
9 The age of the dogs, tumour grade, score of histological differentiation, mitotic rate
 10 and tumour size were not associated with the OS ($P > 0.05$). Considering the Fine and Gray
 11 model, it was observed a tendency of longer survival in dogs of predisposed breeds (Pit bull,
 12 Boxer, Basset Hound e Dalmatian) when compared to dogs of non-predisposed breeds ($P =$
 13 0.05) (Figure 3). In group 2 (dogs with HSA and other neoplasms), the female dogs had a
 14 lower OS rate than the males ($P = 0.03$) by Gray's test, but the Fine and Gray model showed
 15 no difference (Figure 4).



1

2 Figure 3. Survival curves of dogs classified in non-predisposed breeds (black curves),
 3 predisposed breeds (red curves) and mixed breeds (blue curves), for groups of dogs that had
 4 only HSA (group 1) and with concomitantly other neoplasms (group 2).

5



6

7

8 Figure 4. Survival curves of females dogs (F) (black curves) and males (M) (red curves), for
 9 groups of dogs that had only HSA (group 1) and with concomitantly other neoplasms (group
 10 2).

11

12 No significant association was observed between OS and labelling index of fVIII,
 13 COX-2, VEGF, PCNA and Casp-3 ($P > 0.05$). The intensity of labelling of fVIII, COX-2 and
 14 VEGF also showed no difference in OS ($P > 0.05$). As the immunolabelling intensity of
 15 PCNA and Casp-3 was classified as strong in all positive cases, it was not considered in a
 16 survival analysis.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Discussion

The epidemiological data concerning the average age of the animals and sex predilection in this study were consistent with previous reports of cHSA (Hargis *et al.*, 1992; Szivek *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 1994). The higher frequency of short hair breeds predisposed to cHSA and inguinal and abdominal location of the tumours are similar to other studies and suggest solar-induced lesions (Hargis *et al.*, 1992; Szivek *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 1994). In addition, the presence of 35% of dogs with multiple cHSA corroborates this hypothesis. Szivek *et al.* (2012) and Ward *et al.* (1994) also observed multifocal tumours in the skin in 29 and 28% of cases, respectively, and this presentation seems to be frequent in dogs with cHSA. The greater survival in dogs of predisposed breeds observed in this study, agree with the knowledge that the solar induced cHSA presents longer survival time of the dogs (Szivek *et al.*, 2012). This fact is probably related to the different etiologies of cHSA, which reflect in different biological behaviors.

Among the dogs that had other tumours besides HSA, females presented evidence of lower OS. This may be related to a higher proportion of other malignant neoplasms in females (58.3% vs. 25% in males), especially mammary carcinomas, which present a worse prognosis. The HSA of this study showed a very heterogeneous histological pattern, similarly to the described by other authors (Bertazzolo *et al.*, 2005; Goritz *et al.*, 2013; Sabattini and Bettini, 2009). There was no significant difference in the OS of the dogs relative to the various tumour grade and score of histological differentiation, however the number of cases grade 3 (n = 4) and poorly differentiated (n = 7) was not representative.

The median OS time in this study was 365 days, thus the chance of survival of dogs with cHSA being more than 365 days is 50%, while previous reports concerning cHSA

1 presented variable results. Dogs with cHSA limited to the dermis had a median survival time
2 of 780 days whereas dogs with hypodermic and muscular involvement showed a significantly
3 lower survival time of 172 to 307 days, respectively (Ward *et al.*, 1994), and 987 days,
4 without distinction of staging (Szivek *et al.*, 2012).

5 In the present study, no association between the age of the dogs and size of the
6 tumours with OS was observed. In several canine neoplasms, the association between tumour
7 size and survival time is well established (Ferreira *et al.*, 2009; Dennis *et al.* 2011). Probably,
8 this difference is related to the irregular growth pattern of malignant vascular tumours in the
9 skin, leading to inaccurate measures of the tumour diameter (Albores-Saavedra *et al.*, 2011).
10 In addition, cHSA with hypodermal and muscular involvement also difficult a precise gross
11 measure.

12 Interestingly, dogs that had multiple additional primary neoplasms had a longer OS
13 than dogs with only cHSA. In human medicine, the occurrence of multiple primary neoplasms
14 is common in caucasian ancestry and represents longer survival time. This fact can be
15 explained by earlier diagnosis and possibly by the occurrence of genetic alterations which
16 predisposes to the appearance of multiple neoplasms, however with less aggressive biological
17 behavior (Amer, 2014). Analogously, the same event may have occurred in dogs of this study,
18 which are of breeds already known to be predisposed to various neoplastic diseases (Dobson,
19 2013).

20 The prognostic significance of the expression of different markers was assessed. The
21 fVIII is an endothelial cell-specific marker, nevertheless in this study presented weak to
22 strong intensity of labelling, as previously described in canine HSA (Ferrer *et al.*, 1995;
23 Sabattini and Bettini, 2009; von Beust *et al.*, 1988). This protein was not expressed in all
24 tumours probably reflecting an altered phenotype in endothelial cells. This result suggests that

1 fVIII must be used cautiously in the diagnosis of malignant tumours of endothelial cells, and
2 its expression may be not related to survival of dogs with cHSA.

3 Specific mechanisms of COX-2 contributes to the development of malignancies
4 including the inhibition of cellular apoptosis, promotion of tumour angiogenesis, increased
5 tumour cell motility invasiveness, immunomodulatory activity, and the conversion of pro-
6 carcinogens to carcinogens (Fosslien, 2001). This enzyme has been demonstrated to be
7 overexpressed in human sarcomas (Dickens *et al.*, 2002).

8 A previous IHC study of COX-2 in splenic canine HSA, reported no immunostaining
9 for this protein in 19 tumours (Heller *et al.*, 2005). These results differ with the present study,
10 where a weak cytoplasmic expression was observed in 80% of the samples. These findings
11 suggest that COX-2 is expressed in cHSA and may be related with the progression of this
12 neoplasia, suggesting the possibility of a new therapeutic approach, such as the use of COX-2
13 inhibitors and a possible predictive value marker. A study contributes to this hypothesis; the
14 use of COX-2 inhibitors was effective in the suppression of cell proliferation of canine HSA
15 *in vitro* (Pang *et al.*, 2014).

16 The imbalance of pathways related to growth factors has been suspected to be
17 involved in the appearance and progression of HSA (Thamm, 2013). *In vivo* and *ex vivo*
18 studies have demonstrated that the overexpression of VEGF in murine cause neoplastic
19 transformation of endothelial cells (Arbiser *et al.*, 2000). The treatment of tyrosine kinase
20 inhibitor (masitinib mesylate) in cell lines of canine HSA decreased cell proliferation in a
21 dose and time-dependent manner (Lyles *et al.*, 2012). Therefore, the potential of this marker
22 was assessed as an indicator of prognosis, but no relation between OS and VEGF was
23 observed, in the conditions of this study. However, the positive expression of VEGF in almost
24 90% of the cases confirmed the high expression of this growth factor in cutaneous HSA in
25 dogs, possibly a favorable predictive value marker.

1 In this study, similarly to canine ocular HSA (Chandler *et al.*, 2009) a high PCNA
2 expression was observed in all tumours, indicating a high proliferative activity, but with no
3 association with OS. Another marker of cell proliferation, Ki67, was evaluated previously and
4 showed no association with cell differentiation and nuclear pleomorphism in canine HSA,
5 however relationship with survival time was not investigated (Sabattini and Bettini, 2009).

6 The evasion of apoptosis is one of the known abilities of neoplastic cell, contributing
7 with the growth and progression of the tumour. Therefore it is assumed that the expression of
8 Casp-3 should be a predictor of a better prognosis, but this is contradictory in many
9 neoplasms (Amptoulach *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Peiro *et al.*, 2001). According to these
10 studies, the role of this caspase in tumour biology is not fully known. Apoptosis does not
11 appear to be very frequent in cHSA of this study, since the mean expression index of Casp-3
12 was low (9.7%). The relationship of Casp-3 expression to survival of dogs with cHSA was
13 investigated, nevertheless there was no difference. Yet, this marker is probably not a good
14 indicator of prognosis in cHSA.

15 Data regarding recurrence and metastasis would be useful in this study, but this study
16 was retrospective and complete clinical record and follow-up of many cases could not be
17 performed, due to lack of information or interest of the owners or change of veterinary
18 hospital.

19 In conclusion, according to the conditions of this research, features of solar-induced
20 and multiple lesions are frequent in canine cHSA and dogs of predisposed breed have a better
21 prognosis regarding OS. The average age of the dogs affected is 8.5 years and there is no
22 sexual predisposition. Furthermore, the occurrence of multiple other primary neoplasms in
23 dogs with cHSA is common, and these animals tend to have greater OS than dogs that have
24 only cHSA. Expression of COX-2 and VEGF are frequent in canine cHSA and were not
25 related to the OS of the dogs as well as the other markers, however these molecules are

1 possible therapeutic targets to be investigated. Greater numbers of cases of cHSA and more
2 complete disease follow-up data are required to corroborate the significance of these markers
3 in the survival of dogs.

4

5 **Conflict of Interest Statement**

6 The authors declare no competing interest.

7

1 **References**

- 2 Albores-Saavedra J, Schwartz AM, Henson DE, Kostun L, Hart A *et al.* (2011) Cutaneous
3 angiosarcoma. Analysis of 434 cases from the Surveillance, Epidemiology, and End
4 Results Program, 1973-2007. *Annals of Diagnostic Pathology*, **15**, 93-97.
- 5 Amer MH (2014) Multiple neoplasms, single primaries, and patient survival. *Cancer*
6 *Management and Research*, **6**, 119-134.
- 7 Amptoulach S, Lazaris AC, Giannopoulou I, Kavantzas N, Patsouris E *et al.* (2015)
8 Expression of caspase-3 predicts prognosis in advanced noncardia gastric cancer.
9 *Medical Oncology*, **32**, 416.
- 10 Anwar S, Yanai T and Sakai H (2016) Overexpression of Peroxiredoxin 6 Protects Neoplastic
11 Cells against Apoptosis in Canine Haemangiosarcoma. *Journal of Comparative*
12 *Pathology*, **155**, 29-39.
- 13 Arbiser JL, Larsson H, Claesson-Welsh L, Bai X, LaMontagne K *et al.* (2000)
14 Overexpression of VEGF 121 in immortalized endothelial cells causes conversion to
15 slowly growing angiosarcoma and high level expression of the VEGF receptors
16 VEGFR-1 and VEGFR-2 in vivo. *American Journal of Pathology*, **156**, 1469-1476.
- 17 Belluco S, Carnier P, Castagnaro M, Chiers K, Millanta F *et al.* (2016) Immunohistochemical
18 Labelling for Cyclo-oxygenase-2: Does the Positive Control Guarantee Standardized
19 Results? *Journal of Comparative Pathology*, **154**, 186-194.
- 20 Bertazzolo W, Dell'Orco M, Bonfanti U, Ghisleni G, Caniatti M *et al.* (2005) Canine
21 angiosarcoma: cytologic, histologic, and immunohistochemical correlations.
22 *Veterinary Clinical Pathology*, **34**, 28-34.
- 23 Brown NO, Patnaik AK and MacEwen EG (1985) Canine hemangiosarcoma: retrospective
24 analysis of 104 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **186**,
25 56-58.
- 26 Bulakowski EJ, Philibert JC, Siegel S, Clifford CA, Risbon R *et al.* (2008) Evaluation of
27 outcome associated with subcutaneous and intramuscular hemangiosarcoma treated
28 with adjuvant doxorubicin in dogs: 21 cases (2001-2006). *Journal of the American*
29 *Veterinary Medical Association*, **233**, 122-128.
- 30 Carvalho S, Stoll AL, Priestnall SL, Suarez-Bonnet A, Rassnick K *et al.* (2017) Retrospective
31 evaluation of COX-2 expression, histological and clinical factors as prognostic
32 indicators in dogs with renal cell carcinomas undergoing nephrectomy. *Veterinary and*
33 *Comparative Oncology*, **15**, 1280-1294.
- 34 Chandler HL, Newkirk KM, Kusewitt DF, Dubielzig RR and Colitz CM (2009)
35 Immunohistochemical analysis of ocular hemangiomas and hemangiosarcomas in
36 dogs. *Veterinary Ophthalmology*, **12**, 83-90.
- 37 Chen H, Yang X, Feng Z, Tang R, Ren F *et al.* (2015) Prognostic value of Caspase-3
38 expression in cancers of digestive tract: a meta-analysis and systematic review.
39 *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8**, 10225-10234.

- 1 Chen YC, Liao JW, Hsu WL and Chang SC (2016) Identification of the two KIT isoforms
2 and their expression status in canine hemangiosarcomas. *BMC Veterinary Research*,
3 **12**, 142.
- 4 Da Silva L and Fonseca-Alves CE (2017) Pilot assessment of vascular endothelial growth
5 factor receptors and trafficking pathways in recurrent and metastatic canine
6 subcutaneous mast cell tumours. *Veterinary Medicine and Science*, **3**, 146-155.
- 7 Dennis MM, McSporrán KD, Bacon NJ, Schulman FY, Foster RA et al. (2010) Prognostic
8 Factors for Cutaneous and Subcutaneous Soft Tissue Sarcomas in Dogs. *Veterinary
9 Pathology*, **48**, 73-84.
- 10 Dickens DS, Kozielski R, Khan J, Forus A and Cripe TP (2002) Cyclooxygenase-2
11 expression in pediatric sarcomas. *Pediatric and Developmental Pathology*, **5**, 356-364.
- 12 Dickerson EB, Thomas R, Fosmire SP, Lamerato-Kozicki AR, Bianco SR et al. (2005)
13 Mutations of Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 in
14 Canine Hemangiosarcoma. *Veterinary Pathology*, **42**, 618-632.
- 15 Dobson JM (2013) Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *ISRN Veterinary
16 Science*, **2013**, 941275.
- 17 Dore M (2011) Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. *Veterinary Pathology*, **48**,
18 254-265.
- 19 Fernandes SCDN, A.B. (2008). Hemangioma. In: *Oncologia em Cães e Gatos*, ROCA,
20 São Paulo, pp. 612.
- 21 Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD (2009) The relationship
22 between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant
23 canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, **7**, 230-235.
- 24 Ferrer L, Fondevila D, Rabanal RM and Vilafranca M (1995) Immunohistochemical detection
25 of CD31 antigen in normal and neoplastic canine endothelial cells. *Journal of
26 Comparative Pathology*, **112**, 319-326.
- 27 Fine JP and Gray RJ (1999) A proportional hazards model for the subdistribution of a
28 competitive risk. *Journal of the American Statistical Association*, **94**, 496-509.
- 29 Fonseca-Alves CE, Bento DD, Torres-Neto R, Werner J, Kitchell B et al. (2015) Ki67/KIT
30 double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs.
31 *Research in Veterinary Science*, **102**, 122-126.
- 32 Fosmire SP, Dickerson EB, Scott AM, Bianco SR, Pettengill MJ et al. (2004) Canine
33 malignant hemangiosarcoma as a model of primitive angiogenic endothelium.
34 *Laboratory Investigation*, **84**, 562-572.
- 35 Fosslien E (2001) Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced
36 angiogenesis. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **31**, 325-348.
- 37 Giuffrida MA, Bacon NJ and Kamstock DA (2017) Use of routine histopathology and factor
38 VIII-related antigen/von Willebrand factor immunohistochemistry to differentiate
39 primary hemangiosarcoma of bone from telangiectatic osteosarcoma in 54 dogs.
40 *Veterinary and Comparative Oncology*, **15**, 1232-1239.

- 1 Goritz M, Muller K, Krastel D, Staudacher G, Schmidt P *et al.* (2013) Canine splenic
2 haemangiosarcoma: influence of metastases, chemotherapy and growth pattern on
3 post-splenectomy survival and expression of angiogenic factors. *Journal of*
4 *Comparative Pathology*, **149**, 30-39.
- 5 Gray, B (2014). cmprsk: subdistribution analysis of competing risks. R package version 2.2-7.
6 <https://CRAN.R-project.org/package=cmprsk>
- 7 Gregorio H, Raposo T, Queiroga FL, Pires I, Pena L *et al.* (2017) High COX-2 expression in
8 canine mast cell tumours is associated with proliferation, angiogenesis and decreased
9 overall survival. *Veterinary and Comparative Oncology*, **15**, 1382-1392.
- 10 Hargis AM, Ihrke PJ, Spangler WL and Stannard AA (1992) A retrospective
11 clinicopathologic study of 212 dogs with cutaneous hemangiomas and
12 hemangiosarcomas. *Veterinary Pathology*, **29**, 316-328.
- 13 Heller DA, Clifford CA, Goldschmidt MH, Holt DE, Manfredi MJ *et al.* (2005) Assessment
14 of cyclooxygenase-2 expression in canine hemangiosarcoma, histiocytic sarcoma, and
15 mast cell tumor. *Veterinary Pathology*, **42**, 350-353.
- 16 Lyles SE, Milner RJ, Kow K and Salute ME (2012) In vitro effects of the tyrosine kinase
17 inhibitor, masitinib mesylate, on canine hemangiosarcoma cell lines. *Veterinary and*
18 *Comparative Oncology*, **10**, 223-235.
- 19 Murai A, Abou Asa S, Kodama A, Sakai H, Hirata A *et al.* (2012) Immunohistochemical
20 analysis of the Akt/mTOR/4E-BP1 signalling pathway in canine haemangiomas and
21 haemangiosarcomas. *Journal of Comparative Pathology*, **147**, 430-440.
- 22 Murakami M, Sakai H, Kodama A, Mori T, Maruo K *et al.* (2008) Expression of the anti-
23 apoptotic factors Bcl-2 and survivin in canine vascular tumours. *Journal of*
24 *Comparative Pathology*, **139**, 1-7.
- 25 Nikula KJ, Benjamin SA, Angleton GM, Saunders WJ and Lee AC (1992) Ultraviolet
26 radiation, solar dermatosis, and cutaneous neoplasia in beagle dogs. *Radiation*
27 *Research*, **129**, 11-18.
- 28 Pang LY, Argyle SA, Kamida A, Morrison KO and Argyle DJ (2014) The long-acting COX-2
29 inhibitor mavacoxib (Trocoxil) has anti-proliferative and pro-apoptotic effects on
30 canine cancer cell lines and cancer stem cells in vitro. *BMC Veterinary Research*, **10**,
31 184.
- 32 Peiro G, Diebold J, Baretton GB, Kimmig R and Lohrs U (2001) Cellular apoptosis
33 susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax,
34 and caspase-3 expression and outcome. *International Journal of Gynecological*
35 *Pathology*, **20**, 359-367.
- 36 Platt SR, Scase TJ, Adams V, Wieczorek L, Miller J *et al.* (2006) Vascular endothelial growth
37 factor expression in canine intracranial meningiomas and association with patient
38 survival. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary*
39 *Internal Medicine*, **20**, 663-668.
- 40 Ramos-Vara JA and Miller MA (2014) When tissue antigens and antibodies get along:
41 revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue
42 technique. *Veterinary Pathology*, **51**, 42-87.

- 1 Sabattini S and Bettini G (2009) An immunohistochemical analysis of canine haemangioma
2 and haemangiosarcoma. *Journal of Comparative Pathology*, **140**, 158-168.
- 3 Schultheiss PC (2004) A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma
4 and hemangiomas in domestic animals. *Journal of Veterinary Diagnostic
5 Investigation: official publication of the American Association of Veterinary
6 Laboratory Diagnosticians, Inc*, **16**, 522-526.
- 7 Shiu KB, Flory AB, Anderson CL, Wypij J, Saba C *et al.* (2011) Predictors of outcome in
8 dogs with subcutaneous or intramuscular hemangiosarcoma. *Journal of the American
9 Veterinary Medical Association*, **238**, 472-479.
- 10 Smith AN (2003) Hemangiosarcoma in dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North
11 America. Small Animal Practice*, **33**, 533-552.
- 12 Sorenmo KU, Baez JL, Clifford CA, Mauldin E, Overley B *et al.* (2004) Efficacy and toxicity
13 of a dose-intensified doxorubicin protocol in canine hemangiosarcoma. *Journal of
14 Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, **18**,
15 209-213.
- 16 Szivek A, Burns RE, Gericota B, Affolter VK, Kent MS *et al.* (2012) Clinical outcome in 94
17 cases of dermal haemangiosarcoma in dogs treated with surgical excision: 1993-
18 2007*. *Veterinary and Comparative Oncology*, **10**, 65-73.
- 19 Thamm DH (2013) 33 - Miscellaneous Tumors A2 - Withrow, Stephen J. In: *Withrow and
20 MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fifth Edition)*, D. M. Vail and R. L.
21 Page, Eds, W.B. Saunders, Saint Louis, pp. 679-715.
- 22 Vascellari M, Giantin M, Capello K, Carminato A, Morello EM *et al.* (2013) Expression of
23 Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with
24 grading and prognosis. *Veterinary Pathology*, **50**, 110-121.
- 25 von Beust BR, Suter MM and Summers BA (1988) Factor VIII-related antigen in canine
26 endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. *Veterinary Pathology*, **25**,
27 251-255.
- 28 Wang G, Wu M, Maloneyhuss MA, Wojcik J, Durham AC *et al.* (2017) Actionable mutations
29 in canine hemangiosarcoma. *PLoS One*, 12, e0188667.
- 30 Ward H, Fox LE, Calderwood-Mays MB, Hammer AS and Couto CG (1994) Cutaneous
31 hemangiosarcoma in 25 dogs: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal
32 Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, **8**, 345-348.
- 33 Yonemaru K, Sakai H, Murakami M, Kodama A, Mori T *et al.* (2007) The significance of p53
34 and retinoblastoma pathways in canine hemangiosarcoma. *The Journal of Veterinary
35 Medical Science*, **69**, 271-278.
- 36 Yonemaru K, Sakai H, Murakami M, Yanai T and Masegi T (2006) Expression of vascular
37 endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptors (flt-1, flk-
38 1, and flg-1) in canine vascular tumors. *Veterinary Pathology*, **43**, 971-980.

39

40

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

CONCLUSÃO

- Hemangiossarcomas cutâneos em cães são frequentemente múltiplos, não tem predileção sexual e acometem cães jovens à idosos
- Cães de raças predispostas ao hemangiossarcoma cutâneo apresentam melhor prognóstico com relação ao tempo de sobrevida, comparado a cães de raças não predispostas.
- A ocorrência de outras neoplasias primárias em cães com hemangiossarcoma cutâneo é comum e esses tendem a ter uma sobrevida maior.
- A expressão imuno-histoquímica de COX-2 e VEGF é frequente nos hemangiossarcomas cutâneos em cães e não apresenta relação com a sobrevida, porém são possíveis alvos terapêuticos a serem investigados.
- A expressão imuno-histoquímica de fator VIII, PCNA e Caspase-3 não apresenta relação com a sobrevida dos cães.