

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**INVESTIGAÇÃO E VALIDAÇÃO DE FATORES PROGNÓSTICOS
EM HEMANGIOSSARCOMAS ESPLÊNICOS CANINOS**

JULIANA MOREIRA ROZOLEN

Botucatu – SP

Outubro/2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**INVESTIGAÇÃO E VALIDAÇÃO DE FATORES PROGNÓSTICOS
EM HEMANGIOSSARCOMAS ESPLÊNICOS CANINOS**

JULIANA MOREIRA ROZOLEN

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo
Fonseca Alves.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Renée Laufer-
Amorim.

Botucatu – SP
Outubro/2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rozolen, Juliana Moreira.

Investigação e validação de fatores prognósticos em
hemangiossarcomas esplênicos caninos / Juliana Moreira
Rozolen. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eduardo Fonseca Alves

Coorientador: Renee Laufer-Amorim.

Capes: 50501003

1. Cães - Doenças. 2. Neoplasias. 3. Marcadores
genéticos. 4. Endotélio - Tumores. 5. Imuno-histoquímica.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica; Marcadores genicos;
Neoplasia endotelial esplênica; Índice proliferativo.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal - FMVZ- Unesp Botucatu

Prof^a. Dr^a Cristina Massoco

Membro

Departamento de Patologia- FMVZ- USP.

Prof. Dr. Tarso Felipe Teixeira

Membro

Departamento de Patologia– Unip- SJC/UniBrasil/Anhanguera

Dedico esse trabalho aos meus pais que são meu alicerce e que sempre estiveram comigo em meus maiores desafios, meu amor incondicional, ao meu noivo Marco Antônio pelo companheirismo e total incentivo e a minha querida mascote Bizu pelo acolhimento, carinho e amor eterno.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me incentivam no aprimoramento do conhecimento e nos momentos mais difíceis sempre são meu alicerce.

Ao meu noivo Marco Antônio pelo carinho, paciência e dedicação. Gratidão por me apoiar e nunca pensar em desistir.

Ao Prof. Dr. Tarso Felipe Teixeira por me propor desafios cirúrgicos os quais me incentivaram na busca por melhores resultados terapêuticos e pela oportunidade de fazer parte da equipe e pela confiança profissional.

Aos funcionários e colegas de profissão que atuam na clínica Portal Vet no qual trabalhei e suportaram a minha ausência neste grande desafio.

Aos mestrandos e doutorandos que nos ajudaram sempre trocar figurinhas nas dúvidas que surgiram ao longo do programa, em especial destaque Nayara, Fernanda, Tamires, Verônica, Patricia, Antonio e Priscila.

As minhas amigas de pós-graduação Latu Senso: Emanoele Gerceskie, Mariana Frank que também foram super parceiras e incentivadoras.

Aos professores de todo o Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal da FMVZ-UNESP Botucatu, que com certeza contribuíram para esta formação.

A minha coorientadora Profa. Dra. Renée Amorim Laufer mesmo em poucas palavras nos incentiva em busca de melhores resultados com carinho.

E em especial ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves por ter uma paciência gigantesca e aceitado o convite para orientar neste desafio e ter a generosidade imensa de ensinar com tamanha maestria, aproveito para parabenizar por sua extrema dedicação a esta arte.

O presente foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. Introdução	2
2. Revisão de literatura	4
2.1. Etiologia e epidemiologia	4
2.2. Comportamento Biológico.....	5
2.3. Sinais clínicos	7
2.4. Diagnóstico	7
2.4.1. Exames laboratoriais.....	8
2.4.2. Exames de imagem	8
2.4.3. Histologia.....	9
2.4.4. Biomarcadores/ Fatores prognósticos	10
2.5. Tratamentos e Sobrevida Média	13
2.5.1. Cirurgico	13
2.5.2. Radioterapia	13
2.5.3. Quimioterapia	13
2.5.4. Imunoterapia	15
2.5.5. Terapia Alvo	16
2.6. Prognóstico	16
3. Objetivo geral	17
4. Objetivo específico	17
5. Referências.....	17
CAPÍTULO 2	21
1. Introduction.....	24
2. Materials and methods	25
2.1. Study design.....	25
2.2. Morphological analysis.....	25
2.3. Gene expression	25
2.4. Immunohistochemistry	27
2.5. Statistical Analysis.....	28
3. Results.....	28
3.1. Clinical Data	28
3.2. Histopathological Analysis	30
3.3. Gene Expression Analysis	30

3.4.	Claudin-5, PSMA and Ki67 immunoexpression	31
3.5.	Gene and protein expression association with overall survival	34
3.6.	Matrix of multiple correlations	35
4.	Discussion.....	36
5.	References.....	39

Rozolen, M. J. Investigação e validação de fatores prognósticos em hemangiossarcomas esplênicos caninos. Botucatu, 2020. 50p. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, Universidade Estadual Paulista.**

RESUMO

O hemangiossarcoma (HSA) é um tumor maligno das células endoteliais e apresenta comportamento biológico agressivo. Afetam cães de meia idade a idosos e são caracterizados pela formação de novos vasos associados a áreas necróticas e hemorrágicas. Pacientes com HSA esplênico apresentam sintomas como anorexia, distensão abdominal e ruptura esplênica aguda causando óbito em um curto período. Na medicina veterinária, vários estudos avaliaram retrospectivamente a sobrevida global em cães afetados por HSA ou investigaram a expressão de genes e proteínas de diferentes marcadores em amostras de necropsia ou cultura de células. No entanto, um número limitado de estudos combinou ambas as estratégias para identificar novos fatores prognósticos. Conhecendo o potencial de sobrevida e os correlacionando com possíveis marcadores, podemos desenvolver um painel prognóstico e assim, torna-los futuros alvos terapêuticos. Portanto esta pesquisa teve como objetivo associar critérios clínico-patológicos, Claudin-5, PSMA e Ki67 expressão gênica e proteica de à sobrevida global em pacientes afetados pelo HSA. Cinquenta e três amostras de HSA esplênicos previamente diagnosticados por exame histopatológico foram utilizadas nesta pesquisa. A expressão proteica de Claudin-5, PSMA e Ki-67 foram avaliadas pelas técnicas de imuno-histoquímica e a expressão gênica de Claudin-5 e PSMA foram avaliadas por qPCR. As amostras foram classificadas histologicamente em cavernoso (n=23), capilar (n=16) e sólido (n=14). Os marcadores foram superexpressos em amostras de pacientes com metástase em associação ao estágio tumoral. Entretanto, o subtipo sólido apresentou um índice proliferativo mais alto em relação aos demais subtipos histológicos. Identificou-se também um maior índice proliferativo em tumores indiferenciados quando comparados aos HSA esplênicos diferenciados. Nosso estudo confirmou que pacientes com estágio III e doença metastática apresentaram um pior prognóstico. A quimioterapia adjuvante proporciona maior sobrevida global para os pacientes e deve ser indicada para os pacientes com HSA esplênico.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica, neoplasia endotelial esplênica, marcadores gênicos e índice proliferativo.

Rozolen, M. J. Investigation and validation of prognostic factors in canine splenic hemangiosarcomas. Botucatu, 2020. 50p. **Thesis (Master's) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University.**

ABSTRACT

Splenic hemangiosarcoma (HSA) is a malignant tumor from endothelial cells, with aggressive biological behavior. They affect middle-aged and elderly dogs and are characterized by the formation of new blood vessels, commonly associated with necrotic and hemorrhagic areas, leading patients to clinical symptoms of anorexia, abdominal distension and severe acute rupture with death in a short period. Several studies have retrospectively evaluated overall survival in HSA-affected dogs or investigated gene and protein expression of different markers in necropsy samples or cell culture. However, a limited number of studies combined both strategies to identify new prognostic factors. Knowing potential survival and correlating it with possible markers we can develop a prognostic panel and thus make them a future therapeutic target. Thus, this research aimed to associate the clinical-pathological findings, PSMA, Claudin-5 and Ki67 gene and protein expression with overall survival in HSA-affected patients. Fifty-three formalin fixed and paraffin embedded canine splenic HSA samples, previously diagnosed by histopathological examination, were used in this research. Claudin-5, PSMA and Ki67 protein expression was evaluated by immunohistochemistry and the gene expression by qPCR. Histological classification identified were cavernous (n= 23), capillary (n= 16) and solid (n= 14). Markers were overexpressed in samples from patients with metastasis and there were also association with tumor stage. However, solid subtype showed a higher proliferative index when compared to others subtype. It was also identified a higher proliferative index in undifferentiated tumors when compared to differentiated splenic HSA. Our study has confirmed that patients with stage III and metastatic disease present a poor prognosis. The adjuvant chemotherapy provides a higher overall survival for the patients and should indicated for all patients with splenic HSA.

Keywords: Immunohistochemistry, endothelial splenic neoplasia, gene markers, proliferative index.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O hemangiossarcoma esplênico canino (HSA) é uma neoplasia endotelial maligna de comportamento altamente agressivo e heterogêneo, com alto índice metastático e baixa sobrevida (SORENMO et al., 2004). Acometem cães de meia idade a idosos e observa-se uma maior predileção em macho do que em fêmeas. Os HSAs podem induzir diretamente a angiogênese através da produção de fatores pró-angiogênicos, collagenases e proteinases e indiretamente através de células inflamatórias. Por ser uma neoplasia endotelial, a via de disseminação de células tumorais de forma sistêmica é altamente facilitada atingindo seus sítios metastáticos sem dificuldade, proporcionando assim uma alta taxa de metástase entre pacientes acometidos por HSA (SORENMO et al., 2000).

O HSA pode se desenvolver em qualquer localização onde tenha um grande aporte vascular (KIM et al., 2015; MOROZ; SCHWEIGERT, 2007). Representam de 12% a 21 % das neoplasias mesenquimais que acometem os cães (BRAY et al., 2018). Os sítios primários mais comuns são baço, fígado, átrio direito e pele (BARKER et al., 2016; BATSchinski et al., 2018; GÖRITZ et al., 2013; MOROZ; SCHWEIGERT, 2007). Dentre os tumores primários em baço, cerca de 25% deles apresentam metástases cardíacas (MOROZ; SCHWEIGERT, 2007). Os sítios metastáticos mais comuns são os pulmões, fígado, omento e cérebro podendo ocorrer também a transplantação de célula neoplásica em decorrência de ruptura tumoral (CLENDANIEL et al., 2014; KAHN et al., 2013). Apesar da remoção da neoplasia primária, a taxa de sobrevida ainda se mostra baixa muito em decorrência de estadios mais avançados com doença progressiva metastática presente ao diagnóstico (BRAY et al., 2018).

Em humanos, o HSA é denominado de angiosarcoma e é considerada uma neoplasia rara, com acometimento maior em região dérmica e tem sido associado à exposição de dióxido de tório, arsênico, cloridrato de vinil, inseticidas e irradiação ultravioleta (CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000; GÖRITZ et al., 2013), estudos genéticos comparativos entre humanos e cães observam alterações genéticas no gene supressor tumoral Tp53 pela via PI3K e mutação pela substituição da citosina pela tiamina e os caninos são modelos para a investigação desta patologia tão devastadora (MEGQUIER et al., 2019).

Os fatores etiológicos são desconhecidos nos cães, alguns estudos têm correlacionado o surgimento do HSA a uma pré-disposição genética racial, em raças de porte grande como Golden Retriever, Labrador, Rottweiler, Pastor Alemão, Boxer

(CLIFFORD et al., 2001; GÖRITZ et al., 2013; HARGIS et al., 1992; JOHNSON, K. A.; POWERS, B.E, WITHROW, 1989; KIM et al., 2015; SOARES et al., 2017; TAMBURINI et al., 2009; THOMAS et al., 2014).

O surgimento de técnicas para detecção precoce desta doença tornaria mais ágil à conduta clínica de pacientes com HSA esplênicos. Dentre os mecanismos de detecção menos invasivos, foi proposto à avaliação do antígeno de membrana prostático específico (PSMA) em efusões abdominais hemorrágicas de cães (DOWLING et al., 2019). No entanto, esse método foi proposto, mas não foi validado na rotina clínica. O PSMA é uma glicoproteína transmembrana com atividade múltipla enzimática e citoplasmática. Observa-se que a atividade enzimática da folato hidrolase do PSMA, melhora a disponibilidade do ácido fólico, facilitando a angiogênese pelo aumento dos níveis de óxido nítrico pro angiogênico através da regeneração endotelial, por isso ela tem sido estudada como um alvo terapêutico também a neoplasias do endotélio vascular (DOWLING et al., 2019).

Na medicina veterinária ainda não há definido marcadores prognósticos que possam ser amplamente utilizados na rotina clínica, sendo assim, ao longo do tempo, muitos estudos estão em desenvolvimento para conhecer quais marcadores podem nos auxiliar como alvo terapêutico na busca prognóstica. Um dos marcadores que têm sido amplamente estudados é o Ki-67, este é um marcador nuclear de proliferação celular, visto que é expresso em células atípicas presentes em qualquer fase do ciclo celular, exceto a fase G0 a qual a célula está quiescente (YANG et al., 2018).

Em relação a proteínas com valor prognóstico previamente investigada em cães, o Claudin 5 é uma fosfoproteína endotelial exclusiva de junções celulares a qual possui a finalidade de manutenção da integridade vascular e capilar da membrana cerebral regulando o espaço para celular, responsável pela adesão celular e interações proteicas da membrana celular impedindo a difusão de íons de soluto para o espaço intercelular. Possui uma afinidade a tumores vasculares com alta especificidade ao HSA em relação a outros sarcomas e tumores mesenquimais (GREENE; HANLEY; CAMPBELL, 2019). No entanto, seu valor prognóstico não foi investigado em associação com a sobrevivência dos animais (JAKAB et al., 2009). Em humanos, o claudin-5 também apresenta alta especificidade a tumores vasculares e não apresenta expressão em tumores mesenquimais e epiteliais, com exceção de adenocarcinoma pancreático (MIETTINEN; SARLOMORIKALA; WANG, 2011). Assim, tem sido proposto como um marcador diagnóstico promissor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etiologia e epidemiologia

Tumores vasculares de origem endoteliais assim como os hemangioendotelioma, angiossarcomas e HSA são tumores malignos descritos como altamente agressivos e metastáticos. Diferentemente dos humanos, os animais apresentam estes tumores com alta frequência. Os HSA viscerais nos cães compreendem cerca de 5 a 7 % das neoplasias primárias (SMITH, 2003). Acometem animais de meia idade a idosos (8 a 13 anos), porém, há descrição em animais jovens (CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000; SMITH, 2003).

De maneira geral as raças de cães de médio a grande porte são mais predispostas ao acometimento de HSA esplênico, dentre elas estão o Pastor Alemão, Golden Retriever, Labrador, Boxer, English Setter, Pitbull e Poodle. No entanto, os estudos são conflitantes em concordarem sobre a relação da predisposição racial como um fator importante (SMITH, 2003).

Não há uma causa conhecida para formação do HSA, algumas suspeitas em relação à predisposição racial, hereditariedade podem ser consideradas e uma predileção por machos (CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000; MODIANO et al., 2000). O fator hereditário (genótipo) mais o ambiente (fenótipo) ou microambiente tumoral podem levar a mutações aumentando o risco para o desenvolvimento de tais tumores (MODIANO et al., 2000).

A ontogênese do HSA pode se alicerçar em duas hipóteses: uma se define em que células endoteliais nos vasos sanguíneos sofrem mutações e podem, portanto, conferir um caráter maligno favorecendo a proliferação e sobre vivenciada célula endotelial. Na segunda hipótese, acredita-se que o HSA se originaria de células tronco multipotentes derivadas da medula óssea com maturação incompleta e estão próximas ou na fase de comprometimento de endotelial (hemangioblastos). Estas seriam células precursoras endoteliais que migram da medula óssea para os vasos sanguíneos periféricos sendo responsáveis pela angiogênese fisiológica e patológica (LAMERATO-KOZICKI et al., 2006).

A questão hormonal também pode ser considerada já que alguns estudos sugerem que fêmeas castradas apresentaram duas vezes mais chances de desenvolverem HSA esplênicos dos que as não castradas e a castração tardia, após 1 ano de idade predispõe ao

risco de desenvolvimento de HSA em até quatro vezes em fêmeas das raças Golden Retriever e Vizslas(MULLIN; CLIFFORD, 2019).

2.2. Comportamento Biológico

O HSA pode se desenvolver em qualquer vaso sanguíneo, porém, o sítio primário de maior acometimento é o baço (50 a 65%), átrio direito(3 a 25%) e fígado (5 a 6%)(BARKER et al., 2016; BATSCHINSKI et al., 2018; GÖRITZ et al., 2013; SMITH, 2003). A angiogênese realizada pelas células endoteliais tumorais gera novos vasos de aspecto tortuoso e mal formados, levando a formação de coágulos. Quando as células se agrupam podem apresentar coágulos que as impedem de serem nutridas causando assim uma ruptura tumoral e acumulando líquido hemorrágico para as cavidades (derrame hemorrágico) (MODIANO et al., 2000).

A ocorrência de metástase em pacientes com HSA esplênico ao diagnóstico é de 80%, principalmente em fígado, mesentério, pulmões e cérebro, podendo também ocorrer em menor frequência em rins, peritônio, omento, próstata, adrenais e olhos(LIPTAK; DERNELL; WITHROW, 2004; SMITH, 2003). A morte súbita normalmente ocorre devido a rupturas do tumor, quando localizado em cavidades corpóreas (SMITH, 2003).

Para a disseminação metastática e crescimento neoplásico, há uma série de eventos em cascata como a transformação celular, a angiogênese, a motilidade, invasão, embolismo, entrada no leito capilar, aderência a parede capilar e extravasamento do parênquima e alteração do microambiente celular (CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000).

A angiogênese é um processo fisiológico ativado no desenvolvimento fetal, de crescimento, na reparação de feridas e ciclo reprodutivo feminino. Este processo é co-regulado diretamente por fatores angiogênicos e indiretamente por células inflamatórias. Os tumores podem induzir a proliferação vascular, alterando o microambiente local através da superexpressão e indução de fatores angiogênicos, recrutando células locais, mobilizando proteínas da matriz extracelular e reduzindo fatores anti-angiogênicos(CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000; SORENMO et al., 2000).

As metaloproteinases (MMPs) assim como as collagenases, estromelisinases e gelatinases são enzimas que degradam a matriz extracelular, proporcionando assim a alteração do microambiente tumoral e facilitando sua disseminação. A relação das metaloproteinases e as neoplasias não é totalmente conhecida na medicina veterinária, porém, acredita-se que elas estejam envolvidas não somente na promoção da invasão

tumoral via sanguínea ou linfática mas também na regulação de proliferação de sítios primários e secundários e na manutenção do microambiente tumoral (Figura 1), a descoberta destas vias de atuação podem abrir portas para novas formas terapêuticas de combate a evolução tumoral (CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000; SORENMO et al., 2000).

Mutações em gene de supressão tumoral como o localizado no cromossomo 10 (Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 - PTEN) em sua porção C-terminal também podem estar relacionados ao desenvolvimento do HSA esplênico canino, estudos demonstram que o PTEN é dependente da atividade lipídica e inibe a proliferação celular tumoral, atuando de forma inibitória a migração celular e na angiogênese através da via PI3K (DICKERSON et al., 2005).

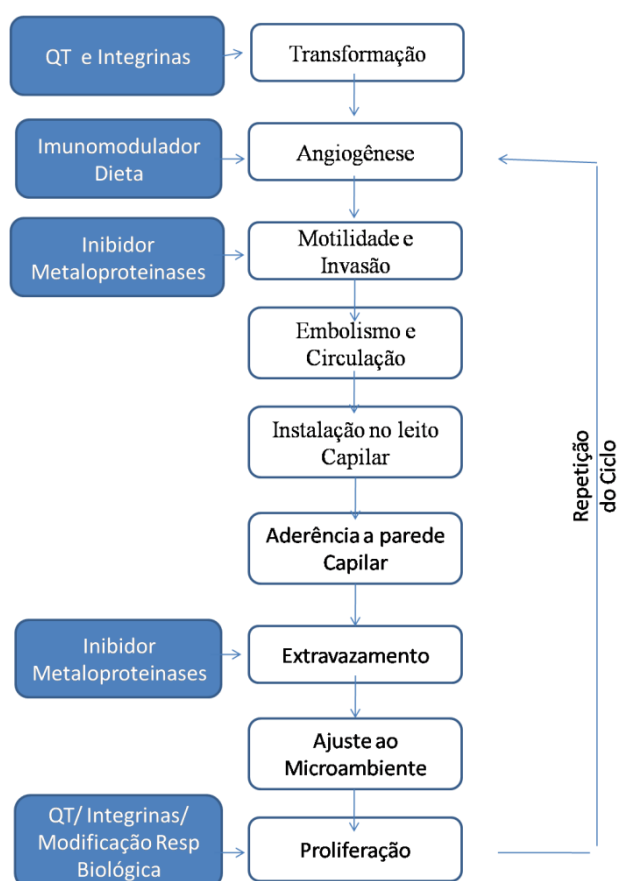


FIGURA 1. Fluxograma dos estágios da cascata da via metastática e alvos terapêuticos com a ação de quimioterapia (QT), inibidores de metaloproteínas, integrinas, imunomoduladores e dieta alimentar. Adaptado: (CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000).

2.3. Sinais clínicos

Pacientes com HSA esplênico normalmente apresentam como sinais gerais: anemia, anorexia, fraqueza, mucosas hipocoradas, letargia, taquipnéia, taquicardia, dor, distensão abdominal, hemoabdome e pode ocorrer choque hipovolêmico quando há ruptura da massa abdominal (MODIANO et al., 2000; MULLIN; CLIFFORD, 2019; SMITH, 2003; SORENMO et al., 2004). Muitas vezes quando há hemoperitônio ou hemoabdome a correlação com o HSA esplênico é bem alta chegando até em mais de 90% (HAMMOND; PESILLO-CROSBY, 2008).

2.4. Diagnóstico

O padrão ouro para o diagnóstico de HSA esplênico é o exame de histopatologia, embora os exames complementares iniciais como exame sanguíneo com painel bioquímico, urinálise, perfil de coagulação, radiografias torácicas, ultrassonografia abdominal, ecocardiografia e tomografia computadorizada também são primordiais para delineamento do perfil do paciente e classificação de estágio clínico através da avaliação pelo sistema TNM (Quadro 1) (MULLIN; CLIFFORD, 2019; SMITH, 2003).

Quadro 1. Sistema clínico TNM para hemangiossarcoma.

Tumor Primário (T)	
T0 – Sem tumor evidente	
T1 – Tumor menor que 5 cm, localizado no órgão e sem invasão dérmica	
T2 - Tumor maior ou igual a 5 cm, rompido ou com invasão dérmica	
T3 – Tumor com invasão a tecidos adjacentes	
Linfonodo Regional (N)	
N0 – Sem linfonodo envolvido	
N1 – Linfonodo regional envolvido	
N2 – Linfonodo distante envolvido	
Metástase a distancia (M)	
M0 – Sem metástase	
M1 – Com metástase confirmada	

Estadio I : T0 ou T1, N0, M0
Estadio II : T1 ou T2, N0 ou N1, M0
Estadio III : T2 ou T3, N0, N1 ou N2, M1

Fonte : Adaptado (MULLIN; CLIFFORD, 2019).

2.4.1. Exames laboratoriais

Dentre as alterações hematológicas a anemia, a leucocitose por neutrofilia, normalmente estão presentes em pacientes com HSA esplênicos e de 30 a 60% dos casos apresentam trombocitopenia secundário a um processo imunomediado e hemorragia ativa ou coagulação intravascular disseminada (CID). Esta, quando presente, está associada à elevação de tempo de protrombina e tromboplastina e decréscimo nos níveis de antitrombina III, fibrinogênio e degradação de subprodutos da fibrina. A coagulação intravascular disseminada pode ser focal ou sistêmica e sua resolução normalmente se dá com a remoção tumoral. Em relação às alterações bioquímicas são inespecíficas com elevação de fosfatase alcalina e aspartato aminotransferase pela infiltração hepática e hipoglicemia às quais podem ser consideradas como síndrome paraneoplásica (MULLIN; CLIFFORD, 2019; SMITH, 2003).

2.4.2. Exames de imagem

2.4.2.1. Radiografia

Radiografias torácicas podem revelar aumento globoso de silhueta cardíaca, efusão pericárdica, tamponamento cardíaco e aumento de átrio direito em casos de massas em base cardíaca e sua sensibilidade para avaliar metástase pulmonar é de 78%, radiografias abdominais podem demonstrar as organomegalias de baço e fígado e massas intrabdominais além de efusão peritoneal causada por hemorragia ativa devido à ruptura (hemoperitônio) (MULLIN; CLIFFORD, 2019; SMITH, 2003).

2.4.2.2. Ultrassonografia

A ultrassonografia abdominal pode detectar efusões e lesões viscerais e em omento para pesquisa de metástase e tumores primários, apresentam uma variedade ecogênica devido a formações sólidas a cavitárias (MULLIN; CLIFFORD, 2019). Associado a imagem ultrassonográfica se pode realizar citologia por aspirado de agulha fina para melhor planejamento cirúrgico e estadiamento do paciente (LEE et al., 2018).

2.4.2.3. Ecocardiografia e eletrocardiografia

Alterações em ecocardiografia são inespecíficas para o HSA esplênico, porém, são mais fidedignas quando há suspeita de HSA cardíaco, com a presença de efusões pericárdicas. Sendo de grande valia para avaliar a função cardíaca para início de terapia com quimioterapia adjuvante. Pacientes com HSA esplênicos podem apresentar arritmias

ventriculares em 44% dos pacientes submetidos à esplenectomia. As arritmias ventriculares podem aumentar o risco de óbito transcirúrgico(MULLIN; CLIFFORD, 2019).

2.4.2.4. Tomografia computadorizada

É de escolha para se obter uma melhor localização anatômica da lesão sem ser invasivo, além de um adequado planejamento e abordagem terapêutica cirúrgica. Possui uma sensibilidade superior a imagem radiográfica, sendo fundamental para detecção precoce de micrometastases pulmonares. Estudos ainda revelam que a tomografia por emissão de prótons (PET-CT) seria ainda mais eficaz, pois além da sensibilidade da tomografia consegue avaliar a capacidade de retenção de glicose na célula neoplásica de forma precoce sendo uma ferramenta importante para a detecção de metástases à distância principalmente aquelas tardias como as de musculatura esquelética (CARLONI et al., 2019).

2.4.3. Histologia

A histopatologia com amostras bem representativas são necessárias, poisas mesmas, normalmente estão repletas de hematomas e áreas de necrose por muitas vezes dificultamos seu diagnóstico mais preciso(SMITH, 2003). Segundo Hendrick et al (1998) microscopicamente os hemangiossarcomas se apresentam em três classificações: capilar (canais vasculares irregulares), cavernoso (canais vasculares expandidos e de aspecto esponjiforme) e sólido (perda dos canais vasculares)(GÖRITZ et al., 2013; KIM et al., 2015).

Os tumores são considerados bem diferenciados quando as células endoteliais se apresentam morfológicamente uniformes e com cordões e canais vasculares preservados, já os considerados pouco diferenciados apresentam a perda ou diminuição destes canais vasculares com predomínio de formações mais sólidas e pleomorfismo mais evidente (NÓBREGA et al., 2019; SCHULTHEISS, 2004).

Este pleomorfismo nuclear é caracterizado por estruturas mais ovaladas, com estruturas multifocais, com evidência de nucléolo, baixa relação núcleo/citoplasma, anisocariose, anisocitose, basofilia, cromatina densa, citoplasma vacuolar e alto índice mitótico e normalmente são classificados em alto grau(GÖRITZ et al., 2013; MULLIN; CLIFFORD, 2019).

2.4.4. Biomarcadores/ Fatores prognósticos

Os biomarcadores específicos para HSA são de grande valia para a detecção precoce da doença e pode de forma mais eficaz promover o manejo terapêutico mais efetivo ao paciente. Desta maneira alguns biomarcadores podem ser utilizados como fator prognóstico tem se destacado para pacientes com HSA esplênico e principalmente os de marcação de proliferação e angiogênese.

Alguns estudos demonstram que células maduras e células precursoras multipotentes de HSA podem expressar em sua superfície marcadores como CD31, vWF (Fator VIII), VEGFR, CD105, CD146, CD34 e c-kit (LAMERATO-KOZICKI et al., 2006).

2.4.4.1. Proliferação celular- Ki-67

O Ki-67 é uma proteína com expressão nuclear responsável pela proliferação celular, o qual ocorre em vários tecidos principalmente em medula óssea e linfonodos. Sua expressão ocorre em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 até a fase M) e está quiescente na fase G0(LI et al., 2015; SMITH, 2003; SYSEL; VALLI; BAUER, 2015; YANG et al., 2018), por esta razão ele é considerado um marcador importante para avaliar fator de crescimento e replicação em uma população celular atípica, pois em células consideradas normais sua expressão é praticamente nula (SCHOLZEN; GERDES, 2000; YANG et al., 2018).

Assim como em estudos com mastocitomas caninos utilizam o valor de expressão do Ki-67 como fator prognóstico e este número já está estabelecido (SCHOLZEN; GERDES, 2000), não há um valor de corte estabelecido para o hemangiossarcoma esplênico. No entanto, a literatura prévia considera esse marcador como padrão ouro na imuno-histoquímica para avaliação de proliferação celular. Isso ocorre, pois sua expressão entre 10-14% já é considerado um alto fator prognóstico para evolução de uma neoplasia (YANG et al., 2018).

Estudos tem demonstrado algumas vias para tentar bloquear a proliferação do Ki-67 na célula através do uso de biologia molecular com nucleotídeo anti-reverso de Ki-67, ácido peptídeo anti Ki-67, RNA interferência (RNAi), siRNA (múltiplos alvos) e imunoterapia (Oncolítico viral anti –Ki-67 e Oncolítico com ação dupla anti –Ki67 e telomerase)(YANG et al., 2018). A caracterização de transcrição gênica do Ki-67 observa-se uma deleção na sequencia *TATA* e um aumento na *GC* no sitio de ligação Sp1 e este sitio de ligação Sp1 é essencial para transcrição gênica para a atividade do Ki-67,

demonstrando um potencial prognóstico para pacientes com distintas neoplasias (LI et al., 2015).

2.4.4.2. CLAUDIN-5

Claudin-5 é uma proteína endotelial exclusiva nas junções celulares, responsável pela integridade e manutenção da membrana vascular, principalmente de capilares de membrana cerebral. A família das Claudinas são proteínas que determinam o tamanho de molécula que podem passar ou não pelo espaço para celular epitelial com o tecido endotelial, por isso quando há o desequilíbrio desta barreira gera desordens neuroinflamatórias, neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (GREENE; HANLEY; CAMPBELL, 2019; JAKAB et al., 2009; MORROW et al., 2010; ORDÓÑEZ, 2012).

A Claudin-5 é a uma fosfoproteína que não é detectada em compartimento epitelial e sim se demonstra restrita em tecidos endoteliais, principalmente, nos tecidos cerebrais, endócrinos, medula óssea, tecidos linfóides, pulmão, fígado, pâncreas, rins, bexiga, trato gastrointestinal, pele e tecidos do reprodutor (GREENE; HANLEY; CAMPBELL, 2019).

A claudin-5 é expressa no tecido endotelial de artérias, capilares e canais sinusoides do baço e não é expressa em células como linfócitos, megacariócitos e macrófagos assim, a claudin-5 se confirma com uma forte sensibilidade e marcação vascular (JAKAB et al., 2009; ORDÓÑEZ, 2012). Sendo uma fosfoproteína o qual compõe essa barreira juncional, ela tem por finalidade melhorar a adesão celular e estreitar as interações com as demais proteínas de membrana para manter a integridade vascular e impedindo a difusão de solutos e íons do espaço intercelular (GREENE; HANLEY; CAMPBELL, 2019).

Em cães a claudin-5 foi fortemente expressa em amostras de hemangiomas e hemangiossarcomas, porém, foi ausentes em tumores mesenquimais tanto benignos quanto nos malignos como os sarcomas (fibroblástico, de tecidos moles, sinovial e hemangiopericitoma). Em humanos, o claudin-5 também apresenta especificidade a tumores vasculares e sem afinidade a sarcomas e carcinomas com exceção de adenocarcinoma pancreático (MIETTINEN; SARLOMO-RIKALA; WANG, 2011).

Em tecidos normais, a expressão da claudin-5 se mostrou restrita no primeiro trimestre de embrião humano a epiderme, íntima camada de vasos que desenvolveriam a espinha e sinusoides hepáticos, após o trimestre o feto já apresenta positividade à células endoteliais dos capilares dos tecidos mole e já não apresenta mais a expressão na

epiderme e em tecidos adultos foi expressa em vários endotélis vasculares principalmente a capilares cerebrais (MIETTINEN; SARLOMO-RIKALA; WANG, 2011).

A especificidade da claudin-5 para o angiosarcoma/ hemangiossarcoma é alta em relação aos demais sarcomas e os tumores mesenquimais e ela também seleciona o angiosarcoma das demais neoplasias endoteliais o que já não ocorre com o marcador CD31(MIETTINEN; SARLOMO-RIKALA; WANG, 2011). No entanto, não há estudos prévios associando a expressão de Claudin-5 como fator prognóstico em hemangiossarcomas caninos.

2.4.4.3. Antígeno de membrana específico para próstata (PSMA)

O antígeno de membrana específico para próstata (PSMA) é uma glicoproteína transmembrana com atividade múltipla enzimática, citoplasmática com predileção em tecidos prostáticos, renais e intestinais do tipo II de 100 KDa. Apresenta-se super expresso em tecidos normais e neoplásicos de epitélio prostático e também em carcinomas renais, transicionais de bexiga, adenocarcinomas, glioblastoma multiforme, pulmonares, melanomas, schwannomas, osteossarcomas e associado a tumores com neovascularização ativa, sendo esta característica utilizada como marcador para o hemangiossarcoma canino (B. et al., 2017; DOWLING et al., 2019).

O intuito do PSMA é promover uma autorregulação da angiogênese através da via das β 1-integrina e quinase 1 ativada pela p21(PAK1) e nesta ativação há a invasão de célula endotelial na matriz extracelular pela interação da sinalização das integrinas e ativação da ligação com a proteína Filamin A, por isso ela além dos processos neoplásicos, também está expressa na reparação neovascular e processos regenerativos. Observa-se que a atividade enzimática da folato hidrolase do PSMA, melhora a disponibilidade do ácido fólico, facilitando a angiogênese pelo aumento dos níveis de óxido nítrico proangiogenico através da regeneração endotelial (B. et al., 2017).

Nestes tumores vasculares (angiossarcomas e hemangiossarcomas) e em efusões hemorrágicas foram analisados e obteve-se que o PSMA encontra se seis vezes mais expresso do que em tecidos normais e mais expressivos do que o marcador CD-31, dessa maneira abre possibilidade do desenvolvimento de testes rápidos para diagnostico *in loco*(DOWLING et al., 2019). No entanto, não houve associação prévia da expressão gênica e proteica de PSMA com fatores clínicos e patológicos dos hemangiossarcomas caninos.

2.5. Tratamentos e Sobrevida Média

2.5.1. Cirurgico

O tratamento de escolha para o hemangiossarcoma esplênico é a remoção da massa tumoral por laparotomia exploratória. Alguns pacientes já apresentam uma grande melhora clínica no pós cirúrgico, porém quando o estadio é mais avançado e apresentam metástases (em 50% dos casos) a recuperação pode não ser tão favorável, autores relatam uma sobrevida média de 19 a 86 dias (MULLIN; CLIFFORD, 2019; SMITH, 2003).

Um comparativo entre pacientes tratados apenas com cirurgia e pacientes tratados com cirurgia e quimioterapia adjuvante demonstrou que não houve diferença significativa em relação ao tempo de sobrevida, sendo que os apenas cirúrgicos apresentaram uma média de sobrevida de 66 dias e os associados à terapia adjuvante uma média de sobrevida de 274 dias (BATSchinski et al., 2018).

2.5.2. Radioterapia

A radioterapia não é amplamente utilizada em pacientes com HSA esplênico, pois como ele é considerado uma doença sistêmica e não localizada, o seu uso torna-se restrito, portanto, pode se utiliza-lo em casos inoperáveis ou associados a comprometimento ósseo e cutâneo como efeito paliativo (MULLIN; CLIFFORD, 2019; SMITH, 2003).

2.5.3. Quimioterapia

O intuito de utilizar a quimioterapia adjuvante após a resseção cirúrgica em pacientes com HSA esplênico com alto índice metastático é aumentar o tempo médio de sobrevida em alguns casos este tempo pode se elevar de 5 a 8 meses comparado a somente a realização de procedimento cirúrgico (3 semanas a 2 meses).

A doxorrubicina é a quimioterapia de eleição para pacientes portadores de HSA esplênico. Ela pode utilizada como agente único (monoterapia) ou combinada com ciclofosfamida e vincristina (poliquimioterapia). (BATSchinski et al., 2018; GÖRITZ et al., 2013; SORENMO et al., 2000, 2004).

Em relação aos efeitos colaterais eles podem ser mais evidentes quando em associação de outros quimioterápicos, podendo apresentar neutropenia e toxicidade gastrointestinal. A sobrevida em pacientes com monoterapia (somente doxorrubicina) e a protocolo doxorrubicina- ciclofosfamida- vincristina são bem semelhantes, sendo a escolha através da avaliação de perfil e tolerância do paciente. Outros protocolos podem utilizados assim como a ifosfamida como agente único ou podem associá-la com a

vincristina, ciclofosfamida e metotrexato apresentaram algum resultado satisfatório (SMITH, 2003), porém a relação de sobrevida também está associada ao índice mitótico da célula endotelial neoplásica (GÖRITZ et al., 2013).

A eficácia dos protocolos quimioterápicos é influenciada pela dose, sua intensidade e sua efetividade em combinação com outros fármacos, sendo caracterizada por uma curva de dose resposta, preconizando a dose máxima tolerada nos protocolos utilizados (SORENMO et al., 2004). Os protocolos mais utilizados para o HSA esplênico são doxorrubicina ($30 \text{ mg/m}^2 \text{ IV}$) a cada 3 semanas totalizando 5 ciclos, doxorrubicina e ciclofosfamida ($50 \text{ a } 75 \text{ mg/m}^2 \text{ IV}$) de 3 a 6 dias, a cada 3 semanas e doxorrubicina, ciclofosfamida ($100 \text{ mg/m}^2 \text{ IV}$) no dia 1 /ciclo e vincristina ($0,75 \text{ mg/m}^2$) no 8º. e 15º. dia como sugestão na Tabela 1 (CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000; SORENMO et al., 2004)

Alguns estudos relatam que a vincristina e ciclofosfamida sem o uso da doxorrubicina não melhoram a sobrevida em pacientes com HSA em comparação a pacientes que utilizaram somente doxorrubicina (SORENMO et al., 2004).

A associação de inibidores de Cox -2 também são promissores juntamente com a terapia adjuvante de doxorrubicina, o uso de deracoxib a $1\text{-}2,1 \text{ mg/kg}$ por via oral foi bem tolerada em cães com HSA esplênico (KAHN et al., 2013).

O uso da darcabazina também foi proposto em associação aos protocolos de doxorrubicina com a melhora do prognóstico possuindo um tempo médio de sobrevida de 550 dias (± 1 ano e meio). Já seu uso em associação com doxorrubicina e vincristina em pacientes sem ressecção tumoral e em estadio mais avançado da doença foi de eficácia em 47,4% dos pacientes com tempo livre de doença de 101 dias e média de sobrevida de 125 dias (BATSCINSKI et al., 2018; MULLIN; CLIFFORD, 2019).

A quimioterapia metronômica que consiste no uso de baixas doses dos fármacos por via oral, também pode ser uma aliada na terapia convencional e no controle de metástase com uma média de sobrevida de 150 dias e aumento médio de sobrevida em paciente sem metástase em até 168 dias (BATSCINSKI et al., 2018). Apresenta uma boa tolerância em longo prazo e pode ser uma alternativa ao tratamento de pacientes com HSA esplênico (LANA et al., 2007). Porém, o seu uso como tratamento de manutenção em pacientes após terapia adjuvante pode ser controverso em relação à melhora de resultado em relação à sobrevida global do paciente (MATSUYAMA et al., 2017).

Estudos demonstram que cerca de 90% dos HSA retroperitoneais possuem metástases à distância. O estágio clínico da doença correlaciona-se ao fator prognóstico.

Sendo assim, pacientes em estágio I se restringem a doença primária e localizada no órgão (257 dias), o estágio II há a ruptura tumoral e disseminação para linfonodo regional (210 dias) e estágio III há a presença de metástase à distância (107 dias) (BATSCHINSKI et al., 2018; SORENMO et al., 2004; WENDELBURG et al., 2015). A quimioterapia inalatória pode ser uma estratégia para inibição de micro metástases pulmonares, após a esplenectomia pode se realizar quatro ciclos de doxorubicina com ciclofosfamida a cada três semanas e associar doxorubicina inalatória manipulada em formato aerossol (CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000).

A talidomida como agente antiangiogênico (2-3mg/kg a cada 24 ou 48 horas) junto com a terapia adjuvante ou metronômica também apresentou um aumento na sobrevida de pacientes com HSA em comparação a pacientes que apenas utilizaram a monoterapia com doxorubicina (MULLIN; CLIFFORD, 2019).

Células *in vitro* de HSA canino que expressavam o antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) responderam seletivamente a uso de um nano conjugado de doxorubicina com liberação controlada do agente através de um aptamero o qual direciona terapia no intuito de realizar uma citorredução para casos de pacientes com HSA canino, estudo ainda é preliminar porem promissor (TANG et al., 2015).

2.5.4. Imunoterapia

O uso de imunomoduladores pode ser benéfico no intuito de aumentar a sobrevida dos pacientes, especialmente combinada com a quimioterapia. A vacina e a L-MTP (triptideomuramyl lipossoma encapsulada) podem de forma não seletiva ativar a linhagem de macrófagos para uma finalidade antitumoral. Ambas associadas ao tratamento do HSA promovem um aumento de sobrevida média entre os pacientes submetidos à quimioterapia, porém não houve aumento de sobrevida significativa em relação às pacientes submetidos somente a cirurgia e aqueles os quais foram submetidos à cirurgia e quimioterapia. A L-MTP tem sido utilizada apenas experimentalmente devido ao seu custo elevado porem é uma promessa para uma futura terapia (CLIFFORD; MACKIN; HENRY, 2000; SMITH, 2003).

Outra possibilidade imunoterapia é o uso de células dendríticas as quais estimulam o sistema imunológico através das células T homologas ao MHC classe I e polarização de H1. Esta polarização é a secreção de citocinas em regulação de moléculas que coestimulam a superfície e induzem as células CD8⁺ secretoras de interferon γ , com esta modulação melhora a apresentação do antígeno e a resposta inata aumentando o potencial

memória durável celular. Assim o uso da imunoterapia em sinergismo com a terapia convencional tem se demonstrado seguro e viável em colaboração a sobrevivência de pacientes com HSA esplênico sendo um possível potencial terapêutico que ainda requer maiores estudos (KONDURI et al., 2019).

2.5.5. Terapia Alvo

Em íntima relação com os biomarcadores ou fatores prognósticos, a terapia alvo consiste em verificar alvos proliferativos e angiogênicos capazes de induzir a disseminação tumoral e bloqueá-las. Desta forma inúmeros estudos tentam desvendar as vias de sinalização de progressão tumoral para melhor elucidá-las e desenvolver alvos terapêuticos a fim de frear sua evolução.

As tirosinas quinases são enzimas envolvidas na proliferação celular através da síntese de DNA. Em pacientes com HSA apresentam esta via está super expressa em relação à pacientes saudáveis, desta forma o uso do Toleranib na dose de 2,5 -3mg/kg por via oral a cada 48h em pacientes com estágio I e II de HSA pode ser recomendado (MULLIN; CLIFFORD, 2019; THAMM et al., 2012).

Alguns estudos também estão bem empenhados em avaliar o microambiente tumoral através das expressões gênicas e proteicas das células tumorais. Seriam futuras perspectivas de tratamento, para uma medicina mais precisa e direcionada ao foco terapêutico individualizado para cada tipo tumoral e perfil de paciente (MODIANO et al., 2000)

2.6. Prognóstico

O prognóstico do HSA esplênico é bem reservado devido a agressividade tumoral, estágio da doença. Massas sólidas e únicas apresentam prognóstico melhor do que massas múltiplas (WENDELBURG et al., 2015).

Pacientes com estágio I e II apresentam uma sobrevivência média um pouco maior (I-250 dias, II-186 dias) em relação há pacientes com estágio III (86 dias). Já outros estudos mostram uma sobrevivência considerável de 180 dias em pacientes que utilizaram protocolos quimioterápicos associados a cirurgia (MODIANO et al., 2000).

Para Goritz *et al* (2013) a sobrevivência não é influenciada pelo tipo histológico, porém observou-se uma curta sobrevivência em pacientes que apresentaram o tipo histológico cavernoso devido a sua íntima relação com sinais de ruptura e hemorragia abdominal.

3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetivou correlacionar os critérios clínico-patológicos com a expressão gênica de *Claudin-5* e *PSMA* e proteica de Ki-67, CLAUDIN -5 e PSMA como fatores prognósticos em hemangiossarcoma esplênicos caninos.

4. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Associar a expressão gênica e proteica de CLAUDIN-5 com dados clínicos patológicos de cães com hemangiossarcoma esplênico.
- Associar a expressão gênica e proteica de PSMA com dados clínicos patológicos de cães com hemangiossarcoma esplênico.
- Correlacionar a expressão de Ki67 com a sobrevida de cães com hemangiossarcoma esplênico.

5. REFERÊNCIAS

B., H. et al. Expression of PSMA in tumor neovasculature of high grade sarcomas including synovial sarcoma, rhabdomyosarcoma, undifferentiated sarcoma and MPNST. **Oncotarget**, v. 8, n. 3, p. 4268–4276, 2017.

BARKER, D. A. et al. Survey of UK-based veterinary surgeons' opinions on the use of surgery and chemotherapy in the treatment of canine high-grade mast cell tumour, splenic haemangiosarcoma and appendicular osteosarcoma. **Veterinary Record**, 2016.

BATSCHINSKI, K. et al. Canine visceral hemangiosarcoma treated with surgery alone or surgery and doxorubicin: 37 cases (2005-2014). **Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 9, p. 967–972, 2018.

BRAY, J. P. et al. Does thalidomide prolong survival in dogs with splenic haemangiosarcoma? **Journal of Small Animal Practice**, v. 59, n. 2, 2018.

CARLONI, A. et al. Prevalence, distribution, and clinical characteristics of hemangiosarcoma-associated skeletal muscle metastases in 61 dogs: A whole body computed tomographic study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 2, p. 812–819, 2019.

CLENDANIEL, D. C. et al. Association Between Macroscopic Appearance of Liver Lesions and Liver Histology in Dogs With Splenic Hemangiosarcoma: 79 Cases (2004–2009). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 50, n. 4, p. e6–e10, jul. 2014.

CLIFFORD, C. A. et al. Plasma Vascular Endothelial Growth Factor Concentrations in Healthy Dogs and Dogs with Hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Internal**

Medicine, v. 15, n. 2, p. 131–135, mar. 2001.

CLIFFORD, C. A.; MACKIN, A. J.; HENRY, C. J. Treatment of Canine Hemangiosarcoma: 2000 and Beyond. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 5, p. 479–485, set. 2000.

DICKERSON, E. B. et al. Mutations of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 in canine hemangiosarcoma. **Veterinary Pathology**, 2005.

DOWLING, M. et al. Overexpression of prostate specific membrane antigen by canine hemangiosarcoma cells provides opportunity for the molecular detection of disease burdens within hemorrhagic body cavity effusions. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0210297, 2 jan. 2019.

GÖRITZ, M. et al. Canine Splenic Haemangiosarcoma: Influence of Metastases, Chemotherapy and Growth Pattern on Post-splenectomy Survival and Expression of Angiogenic Factors. **Journal of Comparative Pathology**, v. 149, n. 1, p. 30–39, 1 jul. 2013.

GREENE, C.; HANLEY, N.; CAMPBELL, M. **Claudin-5: Gatekeeper of neurological function** **Fluids and Barriers of the CNS**, 2019.

HAMMOND, T. N.; PESILLO-CROSBY, S. A. Prevalence of hemangiosarcoma in anemic dogs with a splenic mass and hemoperitoneum requiring a transfusion: 71 cases (2003–2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 4, p. 553–558, 15 fev. 2008.

HARGIS, A. M. et al. A Retrospective Clinicopathologic Study of 212 Dogs with Cutaneous Hemangiomas and Hemangiosarcomas. **Veterinary Pathology**, v. 29, n. 4, p. 316–328, 26 jul. 1992.

JAKAB, C. et al. Claudin-5 protein is a new differential marker for histopathological differential diagnosis of canine hemangiosarcoma. **Histology and Histopathology**, v. 24, n. 7, p. 801–813, 2009.

JOHNSON, K. A.; POWERS, B.E, WITHROW, S. J. **Splenomegaly in Dogs**, 1989.

KAHN, S. A. et al. Doxorubicin and deracoxib adjuvant therapy for canine splenic hemangiosarcoma: A pilot study. **Canadian Veterinary Journal**, 2013.

KIM, J.-H. et al. Pathobiology of Hemangiosarcoma in Dogs: Research Advances and Future Perspectives. **Veterinary Sciences**, v. 2, n. 4, p. 388–405, 2015.

KONDURI, V. et al. Dendritic cell vaccination plus low-dose doxorubicin for the treatment of spontaneous canine hemangiosarcoma. **Cancer Gene Therapy**, v. 26, n. 9–10, 2019.

- LAMERATO-KOZICKI, A. R. et al. Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation. **Experimental Hematology**, 2006.
- LANA, S. et al. Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic hemangiosarcoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 4, p. 764–769, jul. 2007.
- LEE, M. et al. Presurgical assessment of splenic tumors in dogs: A retrospective study of 57 cases (2012-2017). **Journal of Veterinary Science**, v. 19, n. 6, 2018.
- LI, L. T. et al. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 3, p. 1566–1572, mar. 2015.
- LIPTAK, J.; DERNELL, W.; WITHROW, S. Haemangiosarcoma of the urinary bladder in a dog. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 4, p. 215–217, abr. 2004.
- MATSUYAMA, A. et al. Adjuvant doxorubicin with or without metronomic cyclophosphamide for canine splenic hemangiosarcoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 53, n. 6, p. 304–312, 1 nov. 2017.
- MEGQUIER, K. et al. Comparative genomics reveals shared mutational landscape in canine hemangiosarcoma and human angiosarcoma. **Molecular Cancer Research**, v. 17, n. 12, p. 2410–2421, 2019.
- MIETTINEN, M.; SARLOMO-RIKALA, M.; WANG, Z.-F. Claudin-5 as an Immunohistochemical Marker for Angiosarcoma and Hemangioendotheliomas. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 35, n. 12, p. 1848–1856, dez. 2011.
- MODIANO, J. F. et al. Canine Hemangiosarcoma - the Road From Despair To Hope. 2000.
- MOROZ, L. R.; SCHWEIGERT, A. Hemangiossarcoma em cão- relato de casos. **Campo Digital**, 2007.
- MORROW, C. M. K. et al. **Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium** Philosophical Transactions of the Royal Society B: **Biological Sciences**, 2010.
- MULLIN, C.; CLIFFORD, C. A. **Histiocytic Sarcoma and Hemangiosarcoma Update** *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 2019.
- NÓBREGA, D. F. et al. Canine Cutaneous Haemangiosarcoma: Biomarkers and Survival. **Journal of Comparative Pathology**, v. 166, p. 87–96, jan. 2019.
- ORDÓÑEZ, N. G. Immunohistochemical Endothelial Markers. **Advances In Anatomic Pathology**, v. 19, n. 5, p. 281–295, set. 2012.

- SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 322, n. August 1999, p. 311–322, 2000.
- SCHULTHEISS, P. C. A Retrospective Study of Visceral and Nonvisceral Hemangiosarcoma and Hemangiomas in Domestic Animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 6, p. 522–526, 25 nov. 2004.
- SMITH, A. N. Hemangiosarcoma in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 533–552, maio 2003.
- SOARES, N. P. et al. HEMANGIOMAS E HEMANGIOSSARCOMAS EM CÃES: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 192 CASOS (2002-2014). **Ciência Animal Brasileira**, 2017.
- SORENMO, K. et al. Canine Hemangiosarcoma Treated with Standard Chemotherapy and Minocycline Karin. **J Vet Intern Med**, v. 14, p. 395–398, 2000.
- SORENMO, K. U. et al. Efficacy & toxicity of a dose-intensified doxorubicin protocol in K9 HSA. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, p. 209–213, 2004.
- SYSEL, A. M.; VALLI, V. E.; BAUER, J. A. Immunohistochemical quantification of the cobalamin transport protein, cell surface receptor and Ki-67 in naturally occurring canine and feline malignant tumors and in adjacent normal tissues. **Oncotarget**, v. 6, n. 4, 2015.
- TAMBURINI, B. A. et al. Gene expression profiles of sporadic canine hemangiosarcoma are uniquely associated with breed. **PLoS ONE**, 2009.
- TANG, L. et al. Targeting tumor vasculature with aptamer-functionalized doxorubicin-poly lactide nanoconjugates for enhanced cancer therapy. **ACS Nano**, v. 9, n. 5, p. 5072–5081, 26 maio 2015.
- THAMM, D. H. et al. Elevated serum thymidine kinase activity in canine splenic hemangiosarcoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2012.
- THOMAS, R. et al. Genomic profiling reveals extensive heterogeneity in somatic DNA copy number aberrations of canine hemangiosarcoma. **Chromosome Research**, v. 22, n. 3, p. 305–319, 6 set. 2014.
- WENDELBURG, K. M. et al. Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001–2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 247, n. 4, p. 393–403, 15 ago. 2015.
- YANG, C. et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. **Clinical and Translational Oncology**, v. 20, n. 5, p. 570–575, 2018.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO SERÁ SUBMETIDO À REVISTA
“VETERINARY AND COMPARATIVE ONCOLOGY”

Impact Factor: 2.379

Journal guidelines in: <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/14765829>

The figures were inserted in the text to facilitate the panel visualization

Investigation and validation of Claudin-5, PSMA and Ki67 expression as prognostic markers in canine splenic hemangiosarcomas

Juliana Moreira Rozolen¹, Tamires GoneliWichert Teodoro², Renata Afonso Sobral³,
Felipe Augusto Ruiz Sueiro⁴, Marcio Carvalho², Renee Laufer-Amorim², Carlos
Eduardo Fonseca-Alves^{1,5*}

¹Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

²Department of Veterinary Clinic, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

³ONCO CANE- Veterinary – São Paulo- Brazil

⁴VetPat Veterinary Laboratory – Campinas- Brazil

⁵Institute of Health Sciences, Paulista University – UNIP, Bauru, Brazil.

*** Correspondence:**

Carlos E. Fonseca-Alves: carlos.e.alves@unesp.br

Funding

One co-author received scholar ship from São Paulo State Research Foundation – FAPESP (#2015/25400-7) and this study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel- Brazil (CAPES) –Finance Code 001. We also would like to thank the research grant from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (#422139/2018-1).

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

ABSTRACT

Splenic hemangiosarcoma (HSA) is a malignant tumor from endothelial cells, with aggressive biological behavior. They affect middle-aged and elderly dogs and are characterized by the formation of new blood vessels, commonly associated with necrotic and hemorrhagic areas, leading patients to clinical symptoms of anorexia, abdominal distension and severe acute rupture with death in a short period. Several studies have retrospectively evaluated overall survival in HSA-affected dogs or investigated gene and protein expression of different markers in necropsy samples or cell culture. However, a limited number of studies combined both strategies to identify new prognostic factors. Knowing potential survival and correlating it with possible markers we can develop a prognostic panel and thus make them a future therapeutic target. Thus, this research aimed to associate the clinical-pathological findings, PSMA, Claudin-5 and Ki67 gene and protein expression with overall survival in HSA-affected patients. Fifty-three formalin fixed and paraffin embedded canine splenic HSA samples, previously diagnosed by histopathological examination, were used in this research. Claudin-5, PSMA and KI67 protein expression was evaluated by immunohistochemistry and the gene expression by qPCR. Histological classification identified were cavernous (n= 23), capillary (n= 16) and solid (n= 14). Markers were overexpressed in samples from patients with metastasis and there were also association with tumor stage. However, solid subtype showed a higher proliferative index when compared to others subtype. It was also identified a higher proliferative index in undifferentiated tumors when compared to differentiated splenic HSA. Our study has confirmed that patients with stage III and metastatic disease present a poor prognosis. The adjuvant chemotherapy provides a higher overall survival for the patients and should indicated for all patients with splenic HSA.

Keywords: Immunohistochemistry, endothelial splenic neoplasia, gene markers, proliferative index.

1. INTRODUCTION

Splenic canine hemangiosarcoma (HSA) it is a highly aggressive malignant neoplasm, originated from endothelial cells with a high metastatic rate and poor outcome. It is one of the most aggressive and metastatic cancer in dogs⁽¹⁻⁵⁾. Vascular tumors represent about 5 up to 7% of canine neoplasms and the prevalence of HSA can be 0,3% up to 2 % in all the tumors in dogs⁽⁶⁻⁸⁾. They affect middle-aged dogs to the elderly and there is a greater predisposition to affect males than females ⁽¹⁻⁵⁾. Splenic HSA can develop metastasis in right atrium in 25% of cases^(9,10). The most common metastatic sites are liver, lungs, but less frequently in omentum, kidneys, retroperitoneum and skin^(5,7,10-13). In human, HSA is called angiosarcoma and is considered a rare neoplasm and has been correlated with exposure to thorium dioxide arsenic, vinyl hydrochloride, insecticides and irradiation, some studies had been demonstrated potential drivers mutations that could potential therapeutic targets but in dogs, the etiological factors are unknown^(6,12,14). Splenectomy is the gold standard treatment for splenic HSA; however, due the poor outcome, adjuvant chemotherapy has been associated with controversial results.

Due the limited information regarding markers with prognostic value for canine HSA. Generally canine tumor, the main prognostic markers are related to proliferation and angiogenesis. Our research aimed to associate clinical pathological findings with Claudin-5, PSMA(Prostate-specific membrane antigen) and Ki67 expression as prognostic markers in canine splenic HSA. Claudin-5 is a tight junctional membrane protein responsible for the integrity and maintenance of the vascular membrane^(15,16). Claudin-5 was detected in membrane of neoplasm endothelial cells in all histological types of HSA⁽¹⁷⁾. PSMA was detected in biologic fluid in patients with HSA, it was readily identifiable in hemorrhagic effusions, it's a potential value for early detection molecular diagnostic test for presence microscopy HSA disease⁽¹⁸⁾. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) is a membrane glycoprotein, highly expressed in prostate epithelium, prostate cancer and also neovasculature⁽¹⁹⁾. In normal tissues, PSMA is negative and overexpression occurs in neoplastic endothelium neovasculature^(18,20). Among the markers, Ki-67 is a nuclear protein widely used for evaluation of cell proliferation. This protein is expressed only in proliferating cells and its expression occurring all active phases of cell cycle, including early division, observed mainly in patients with high stage and poor prognostic⁽²¹⁾. Due the lack of prognostic markers for canine HSA, this research

aimed to evaluate the Claudin-5, PSMA and Ki56 prognostic factor in a subset of canine splenic HSA.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study design

This was a retrospective non-randomized study, including 53 canine splenic HSA cases from São Paulo State University-UNESP and ONCOCANE Oncology center. The inclusion criteria for this study were: patients with histopathological analysis confirming splenic HSA diagnosis, presence of complete clinical information and availability of the paraffin blocks from the primary tumor. This study was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals (204/2018) and all owners signed an informed consent allowing to use the samples in this research.

It was included in this study only patients with imaging exams (abdominal ultrasound or computed tomography and three-view thoracic x-ray) to perform tumor staging, with histopathological analysis confirming a splenic hemangiosarcoma and sufficient amount of tissue in paraffin blocks to perform further techniques. It was excluded patients without clinical information, with other primary tumors at the diagnosis and tumors with no internal Ki67 positive expression. A total of 53 out of 111 samples met the inclusion criteria.

2.2. Morphological analysis

From the paraffin blocks, a new section was obtained and stained with hematoxylin and eosin. Histological and subtype histological evaluation was performed using an optical microscope by two collaborators (JMR and CEFA) according to Hendrick *et al* (1998).

Since most of the antibodies are produced to cross react with human tissue, we verified the cross reactivity of all antibodies with canine tissue. The reactivity of the Ki-67 antibody (Clone MIB-1-Dako Omnis-) has been provided by the manufacturer. Claudin-5 was previously validated by Jakab *et al.*⁽¹⁷⁾ and the reactivity of PSMA with canine tissue was previously reported by Dowling *et al.*⁽¹⁸⁾.

2.3. Gene expression

Transcript levels were evaluated for *Claudin -5* and *PSMA* tissue fixed in formalin and embedded in paraffin was used for RNA extraction. For mRNA extraction, five tissue sections with 6µM were placed with histological slides and tumor areas were

macrodissected using a scalpel and mRNA was extracted using a commercial kit (Recover All™ total nucleic acid kit, Ambion Life Technologies, MA, USA) according to the manufacture instructions. mRNA concentration was defined with a spectrophotometer (Nano Drop™, ND-8000, Thermo Scientific, MA, USA). cDNA was synthesized in a final volume of 20 µL and each reaction contained 1 µg of total RNA treated with DNase I (Life Technologies, Rockville, MD, USA), 200 U of SuperScript III reverse transcriptase (Life Technologies), 4 µL of 5X SuperScript First-Buand Strand, 1 µL of each 10 mM dNTP (Life Technologies), 1 µL of Oligo-(dT) 18(500ng/ µL)(Life Technologies), 1 µL of random hexamers (100ng/ µL)(Life Technologies) and 1 µL of 0,1 M DTT (Life Technologies). A reverse transcription was performed for 60 min at 50°C and enzyme was inactivated for 15 min at 70°C. The cDNA was stored at - 80°C.

The genes were demonstrated in table1.

Table 1. Identification and sequence of the primers used for qPCR.

Expression Product	Gene ID	Expression primer sequence (5' - 3')
CLAUDIN-5	100684266	Forward: CCTTTGTGTTTCTGCTCTCTGA Reverse: CCCAGTGTCTCCAGTGACTCA
PSMA	476775	Forward: TCGATTGCACCCCACTGAT Reverse: GGGCTTTGGAGCTCCTTTGT
ACTB	487218	Forward: TACAGCTTCACCACCACTGC Reverse: CTTCTCCATGTCGTCCCAGT
GAHPD	403755	Forward: CATCAACGGGAAGTCCATCT Reverse: TACTCACCACCAGCATCACC
HPRT	442945	Forward: CGGCTTGCTCGAGATGTGAT Reverse: GCACACAGAGGGCTACGATGT
RPL8	475130	Forward: CCATGAATCCTGTGGAGC Reverse: GTAGAGGGTTTGCCGATG
RPS19	476450	Forward: CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG Reverse: GTTCTCATCGTAGGGAGCAAG
RPS 5	476366	Forward: TCACTGGTGAGAACCCCT Reverse: CCTGATTCACACGGCGTAG

The reaction was conducted in a total volume of 10 µL containing Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), 1 µL of cDNA (1:10) and 0.3 µM of each primer pair in triplicate using Quant Studio 12K Flex Thermal

Cycler equipment (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). A dissociation curve was included in all experiments to determine the PCR product specificity.

2.4. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed in charged slides, using a polymer system and 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) as a chromogen. Initially, Ki67 (clone MIB-1) staining was performed in all paraffin blocks (n=53) and samples without Ki67 positive expression (internal control) were excluded from this research (n=6). Antigen retrieval was performed in a pressure cooker (Pascal, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) with pH 6.0 citrate buffer solution and the endogenous peroxidase blockage was performed with 8% hydrogen peroxide diluted in methyl alcohol for 1 hour for Ki-67 and Claudin 5. For the PSMA antibody, the peroxidase blockage was made for 30 minutes. A commercial Protein block reagent (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) was used to block non-specific proteins (Table 2).

Mouse monoclonal Ki-67 antibody (Clone MIB-1, DakoOminis, Santa Clara, CA) was diluted at 1:50, mouse monoclonal CLAUDIN-5 antibody (Zymed Inc, San Francisco, CA, USA) and mouse monoclonal PSMA (Novus Biological, Littleton, CO) at dilutions 1:200 and 1:2000, respectively. Then, slides were incubated with DakoEnVision™+ Dual Link System-HRPsecondary antibody for one hour and the chromogen IP FLX DAB (Dako Ominis, Santa Clara, CA). The slides were counter stained with hematoxylin. Positive control was internal blood vessels for Claudin-5 and PSMA, a normal prostatic tissue was used. Negative control was performed by replacing the primary antibodies with immunoglobulins. The protocol information is available in Table 2.

Immunocytochemical expression was evaluated using Image J software (ImageJ v1.47; NIH, Bethesda, MD, USA) according to the Da Silva et al. (2017)⁽²²⁾. Briefly, a threshold tool was determined for Claudin-5 and PSMA expression, based on positive stained cells. Then, the analysis was made in five fields (40 X) of each sample and a mean expression was used as a final score. The threshold values for Claudin-5 were: hue (1 - 255), saturation (15 - 255) and brightness (100 - 175). For the PSMA expression, the values were: hue (1- 255), saturation (30 - 255) and brightness (100 - 180). The evaluation of Ki67 was performed though manual counting of at least 1000 cells (positive and negative) in five high power fields (400x). Then, the number of o positive cells dived by

the total of cells was determined as a percentage of positive cells. The final Ki67 index was determined as a mean of the five fields.

Table 2. Specification of the immunohistochemistry protocol used in this research.

Antibody	Clone	Peroxidase Blockage	Concentration	DAB
Ki-67	Clone MIB-1(Dako Ominis, Santa Clara, CA)	1 hour	1: 50	5min
CLAUDIN-5	Monoclonal mouse anti-human antibodies (Zymed Inc, San Francisco, CA, USA)	1 hour	1:200	1min
PSMA	Anti-human mouse (Novus Biological, Littleton, CO)	30 min	1:2000	1min

PSMA= Prostatic specific membrane antigen.

2.5. Statistical Analysis

For the immunohistochemistry analysis, it was performed a qualitative evaluation, describing each marker immunolocalization. For statistical propose, we group samples according to the clinical-pathological criteria and compared the different categorical variables with overall survival (OS). Including histological subtypes, metastatic status, clinical stage and treatment using the log-rank test and the Kaplan-Meier curves. The immunohistochemical and gene expression results were evaluated as a mean expression, and then, divided into two groups (low or high expression). Samples with expression equal or lower tha mean value as classified as low expression and samples with expression higher than mean value was classified as high. For comparisons using the markers and survival data, we evaluated samples from patients that underwent only surgery and surgery associated with chemotherapy, separately. Since overall adjuvant treatment can affect patient's overall survival. To evaluate the correlation among all variables, it was performed the matrix of multiple correlation using Spearman test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v.8.1.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. RESULTS

3.1. Clinical Data

The mean age of these patients was 10.7 years (± 2.0), 79.24% was female (n= 42) and 20.75% was male (n= 11). Mixed breed dogs were the most affected (n=22)(41,51%), followed by Pit Bull (n=7)(13,21%), Cocker Spaniel (n=3)(5,66%), Daschround (n=3)(5,66%), Golden Retriever (n=3)(5,66%), Border Collie (n=2)(3,77%),Boxer (n=2)(3,77%), German Shepherd (n=2)(3,77%), Poodle (n=2)(3,77%), Shepherd Belgian

(n=2)(3,77%), Brazilian Mastiff (n=1)(1,89%), Labrador (n=1)(1,89%), Lhasa Apso (n=1)(1,89%), Schnauzer (n=1)(1,89%) and Yorkshire (n=1)(1,89%). The presence of metastasis at diagnosis occurred in 60.38% (n=32) of the cases and the most prevalent sites were liver (n=18), lung (n=6), heart (n=2) and skin (n=6). There was statistical difference between non-metastatic and metastatic patients ($P<0.0001$)(Figure 1B). Regarding the clinical stage 58.9% was on stage III (n=31), 28.3% stage II (n=15) and 13.2% stage I (n=7). There was statistical difference among patients with stage I, II or III and overall survival ($P=0.0444$) (Figure 1C).

The mean overall survival was 155.94 days (± 148.37), independent of patient's treatment (Figure 1A). For sixty six percent of the patients surgery was the only treatment option (n= 35), 27% had surgery and adjuvant chemotherapy (n=14) and 7% received no treatment (n=4). Patients who only underwent surgery had an average survival of 128.83(± 118.84) days, those who underwent surgery and chemotherapy had 262.43(± 243.53) days and those who did not undergo any treatment survived for 20.50(± 19.5) days (Figure 1D). Thus, patients treated with surgery associated with chemotherapy experienced a higher survival time.

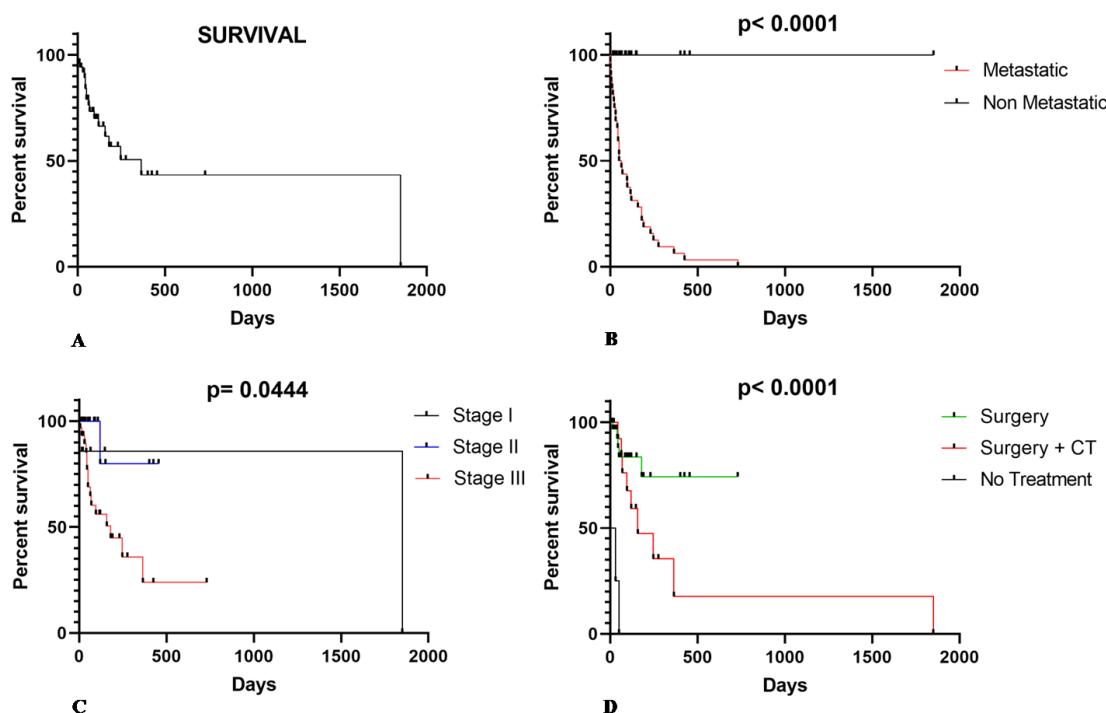


Figure 1. (A) Overall survival in HSA-affected dogs according to the clinical pathological criteria. (B) Patients with metastatic splenic HSA experienced a lower survival time ($P<0.0001$). (C) Patients with stage III show lower survival time than stage I and II patients ($P=0.0444$). (D) Patients that received surgical or surgery associated with adjuvant chemotherapy as treatment has a higher survival time than those that did not receive treatment or only surgery treatment ($P<0.0001$).

3.2. Histopathological Analysis

Tissue samples were classified in cavernous (n= 23, 44%), capillary (n= 16, 30%) and solid (n= 14, 26%) (P=0.1286). Then, according to the degree of differentiation, samples were also classified as differentiated (n= 39, 74%) and undifferentiated (n=14, 26%) (P=0.3837).

3.3. Gene Expression Analysis

Claudin-5 showed a $3.36(\pm 2.9)$ mean of relative quantification and there was no statistical difference in Claudin 5 gene expression comparing metastatic and non-metastatic samples (P=0.8266). Regarding the tumor stage, there was no statistical difference in overall survival among the three stages (P=0.4804) or when compared stage I and II (P=0.3011), stage I and III (P=0.5142) or stage II and III (P=0.4448). It was also associated Claudin-5 expression with the different histological subtypes. When compared Claudin-5 expression among capillary, cavernous and solid subtypes, there was no statistical difference (P=0.2959). The Claudin-5 expression did not differ when compared capillary and cavernous (P=0.6573), capillary and solid (P=0.4252) or cavernous and solid (P=0.1338). When tumors were grouped as differentiated and undifferentiated patterns, no statistical difference was observed (P=0.1415). Then, it was compared Claudin-5 expression with the patient's overall survival. No survival association was observed survival in patients with low Claudin-5 expression, compared with patients showing high expression (P=0.4244).

PSMA mean of real time quantification was 5.26 ± 5.19 . There was no statistical difference in PSMA gene expression comparing metastatic or non-metastatic samples (P=0.1555). Regarding the tumor stage, there was statistical difference among the three stages (P=0.041), with patients with tumor stage III expression higher PSMA levels. There was no statistical difference of PSMA expression between tumor with stage I and II (P=0.1807) or stage I and III (P=0.9699). On the other hand, samples from patients with tumor stage III expressed more PSMA than tumor samples with stage II (P=0.0319). When associated histological subtype with PSMA gene expression, it was not identified statistical difference among capillary, cavernous and solid histological types (P= 0.1815). However, it was identified statistical difference when compared cavernous with capillary (P=0.046) and cavernous with solid (P=0.05). There was no statistical difference between capillary and solid (P=0.9497). Although PSMA was associated with tumors tag and

histological type, no association of PSMA expression was found with overall survival ($P=0.4080$). All these data were demonstrated in table 3.

Table 3. Gene expression results

Gene	Claudin-5	PSMA
Relative Quantification (RQ)	3.36($\pm$ 2.9)	5,26 ($\pm$ 5,19)
Overall Survival	$P=0.4244$	$P=0.4080$
Metastatic Status	$P=0.8266$	$P=0.1555$
Stage	$P=0.4804$	$P=0.041^*$
Stage I x II	$P=0.3011$	$P=0.1807$
Stage I x III	$P=0.5142$	$P=0.9699$
Stage II x III	$P=0.4448$	$P=0.0319^*$
Histological Types	$P=0.2959$	$P= 0.1815$
Capillary x Cavernous	$P=0.6573$	$P=0.046^*$
Capillary x Solid	$P=0.4252$	$P=0.9497$
Cavernous x Solid	$P=0.1338$	$P=0.05^*$
Differentiated x Undifferentiated	$P=0.1415$	$P=0.3285$
Treatment	$P=0.1684$	$P=0.3580$

*Statistical Difference

3.4. Claudin-5, PSMA and Ki67 immunoexpression

Claudin-5 presented membranous and cytoplasmic staining (Figure 2 A, B and C) in endothelial neoplastic cells and also the pre-existing blood vessels. PSMA presented cytoplasmic staining (Figure 2 D, E and F) in only in neoplastic cells and Ki-67 was nuclear of endothelial neoplastic cells (Figure 2 G, H and I) and in internal controls blood vessels and remaining splenic germinal center). Claudin-5 protein showed a mean expression of 12% ($\pm$ 5.73%) among has samples. Claudin-5 protein was overexpressed in samples from patients with metastatic.

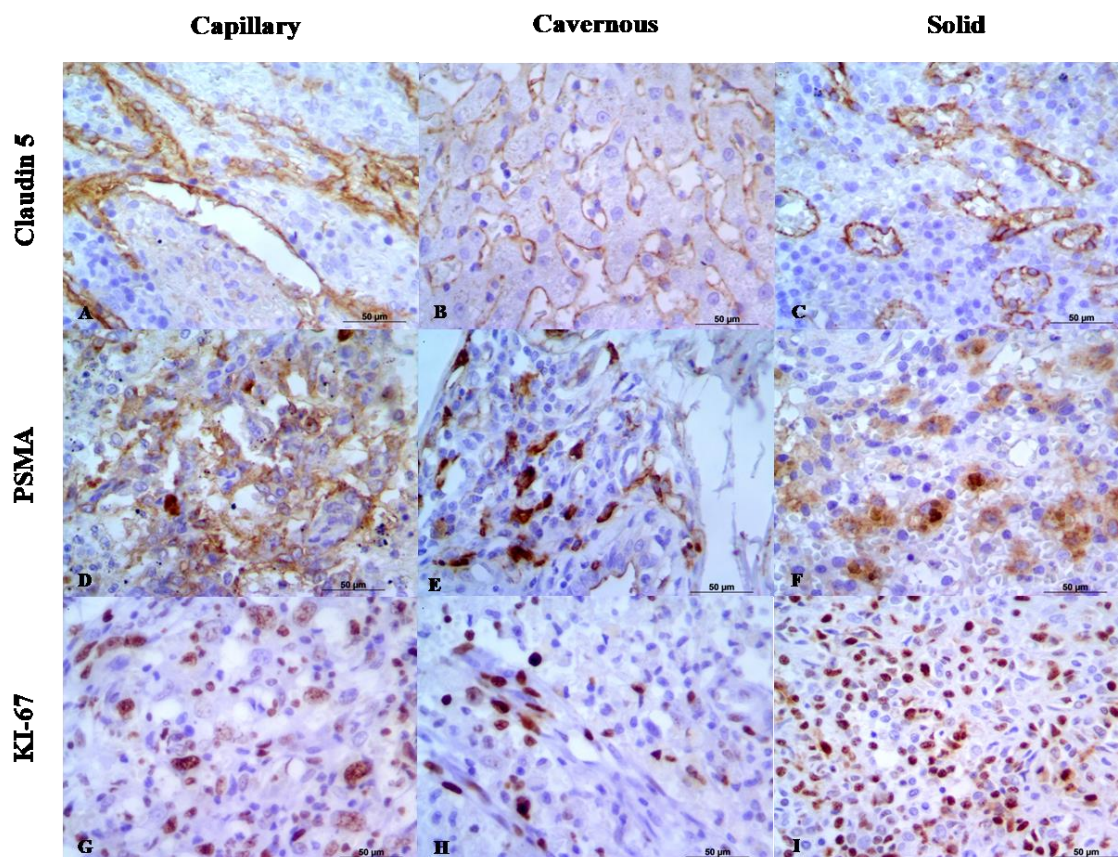


Figure 2. Claudin-5 presented a membranous and cytoplasmic staining in endothelial neoplastic cells and also the pre-existing blood vessels in capillary type (A), cavernous type (B) and solid type (C). PSMA presented a cytoplasmic staining in capillary type (D), cavernous type (E) and solid type (F) and Ki-67 stained the cell nuclei of endothelial neoplastic cells in capillary type (G), cavernous type (H) and solid type (I).

Higher Claudin 5 expression was observed among metastatic samples compared with non metastatic samples ($P=0.0078$). Association of Claudin-5 expression with tumor stage, with stage III tumors with higher expression the stages I and II ($P=0.0451$) (Figure 3).

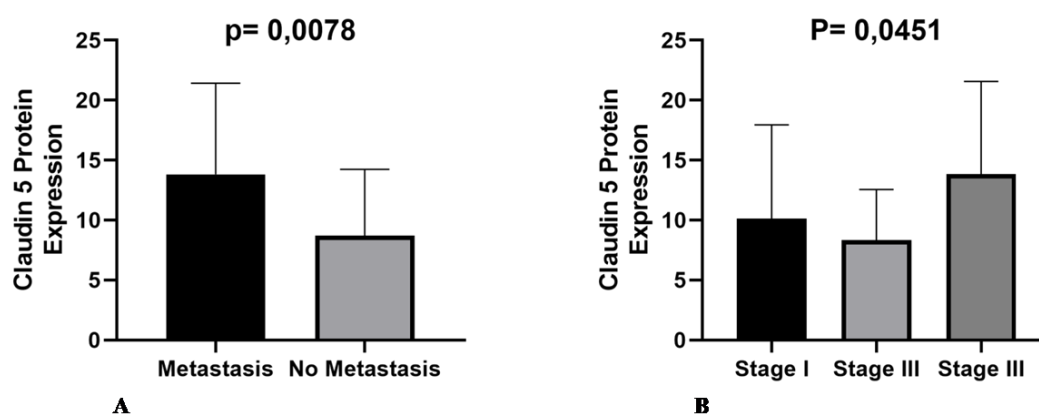


Figure 3. (A) Metastatic samples had a higher Claudin-5 expression compared with non metastatic samples ($P=0.0078$). (B) Association of Claudin-5 expression with tumor stage, with stage III tumors with higher expression the stages I and II ($P=0.0451$).

It was investigated the association of Claudin-5 protein expression with the different histological subtypes and no statistical difference was observed among capillary, cavernous and solid patterns ($P=0.2460$). Statistical difference was not observed when compared capillary and cavernous ($P=0.2897$), capillary and solid ($P=0.5439$) or cavernous and solid ($P=0.1196$). Tumor were also grouped in differentiated and undifferentiated patterns ($P=0.1663$).

PSMA protein expression presented 5% ($\pm 3.89\%$) mean expression in HSA samples and there was no association between PSMA protein expression and the patient's metastatic status ($P=0.5650$). Regarding the tumor stage, there was no statistical difference among the three stages and PSMA protein expression ($P=0.2804$). Comparison between two different stages were made and there was no statistical difference when compared tumor stage I and II ($P=0.1455$), I and III ($P=0.1931$) or stage II and III ($P=0.5401$). PSMA protein expression did not differ among the three histological subtypes ($P=0.2653$) or when compared capillary and cavernous ($P=0.1685$), capillary and solid ($P=0.7336$) or cavernous and solid ($P=0.2022$). When compared differentiated and undifferentiated patterns, no statistical difference was observed ($P=0.3372$).

The Ki-67 expression was evaluated in 47 out of 53 samples, because in six samples, it was not possible to evaluate 1000 cells. The mean Ki67 expression was 16% ($\pm 14.06\%$) and there was no association with Ki67 expression and patient's metastatic status ($P=0.8323$). On the other hand, it was identified an association among Ki67 index and tumor stage, with tumor stages II and III showing a higher Ki67 index when compared to stage I ($P=0.0144$). It was observed higher Ki67 index in tumor stage II ($P=0.0033$) and III ($P=0.0355$), when they were individually compared with stage I. On the other hand, there was no statistical difference between tumor stages II and III ($P=0.1222$). There was no statistical difference among Ki67 expression and the three different histological subtypes ($P=0.0942$) or when compared capillary and cavernous ($P=0.3044$), cavernous and solid ($P=0.1284$). Solid subtypes showed a higher proliferative index when compared to capillary subtype ($P=0.0433$). It was also identified a higher proliferative index in undifferentiated tumors when compared to differentiated HSA ($P=0.05$). All these results were demonstrated in table 4.

Table 4. Protein expression results

Protein	Claudin-5	PSMA	Ki-67
Relative Quantification (RQ)	12% ($\pm 5.73\%$)	5% ($\pm 3.89\%$)	16% ($\pm 14.06\%$)
Overall Survival	P=0.0078*	P=0.8979	P=0.4542
Metastatic Status	P=0.9390	P=0.5650	P=0.8323
Stage	P=0.0451*	P=0.2804	P=0.0144*
Stage I x II	P=0.9589	P= 0.1455	P=0.0033*
Stage I x III	P=0.0377	P= 0.1931	P=0.0355*
Stage II x III	P=0.0152*	P= 0.5401	P=0.1222
Histological Types	P=0.2460	P=0.2653	P=0.0942
Capillary x Cavernous	P=0.2897	P=0.1685	P=0.1685
Capillary x Solid	P=0.5439	P= 0.7336	P=0.0433*
Cavernous x Solid	P=0.1196	P=0.2022	P= 0.1284
Differentiated x Undifferentiated	P=0.1663	P=0.3372	P=0.05*
Treatment	P=0.1294	P=0.0805	P=0.0043*

*Statistical Difference

3.5. Gene and protein expression association with overall survival

The *Claudin-5* mean of gene expression in samples from patients treated with only surgery was 2.478 ± 2.4 (n=35) and 5.3 ± 5.6 (n=14) for the patients treated with surgery and chemotherapy. For the *Claudin-5* protein expression, the mean expression for patients that underwent only surgery was 10.6 ± 6.9 and 14.1 ± 6.1 for patients treated with surgery and chemotherapy. There was no statistical difference between *Claudin-5* low or high gene expression in patients treated with surgery (P=0.424) or surgery associated with chemotherapy (P=0.8454). There was no statistical difference regarding *Claudin-5* expression in samples from patients submitted to surgery (P=0.694) or surgery associated with chemotherapy (P=0.4001).

PSMA gene expression in samples from patients submitted to surgery showed a gene mean expression of 10.6 ± 6.9 and patients treated with surgery and chemotherapy had a gene mean expression of 14.1 ± 7.4 . Regarding *PSMA* protein expression, the samples from patients submitted to surgery was 4.8 ± 3.9 and 4.8 ± 4.3 mean expression in the group of patients treated with surgery and chemotherapy. There was no statistical difference between *PSMA* gene expression and overall survival in patients submitted to surgery. On the other hand, in the group of patients submitted to chemotherapy, patients

with PSMA low expression experienced a higher survival time ($P=0.05$). For the patients treated with surgery, low PSMA protein expression was associated with an increased survive time ($P=0.0355$) (Figure 4A). However, when the patients were treated with chemotherapy, the opposite relation was observed. Patients with lower PSMA protein expression experienced a shorter survival time ($P=0.0113$) (Figure 4B).

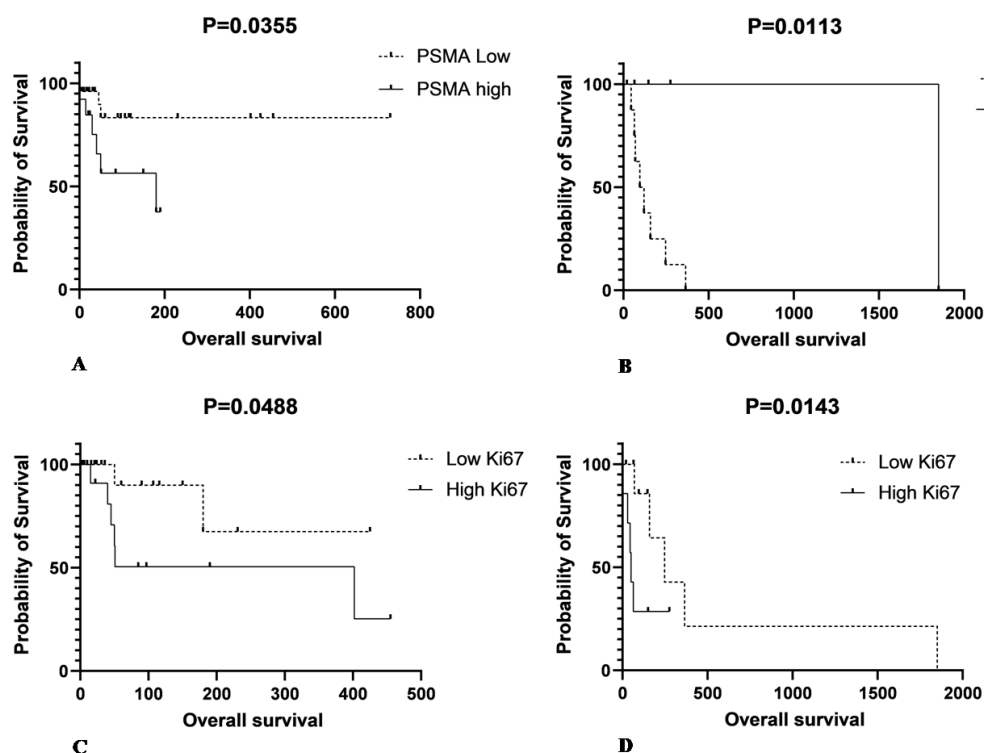


Figure 4. (A) Patients underwent surgery presented low PSMA protein expression whose associated increased survive time ($P=0.0355$), (B) Patients were treated with chemotherapy with lower PSMA protein expression observed a shorter survival time ($P=0.0113$), (C) A higher survival time was observed in patients submitted to surgery and had a low Ki67 index ($P=0.0488$) and (D) a higher survival time for patients with low Ki67 index in the group of patients treated with chemotherapy ($P=0.0143$).

The mean Ki67 proliferative index in patients submitted to surgery was 20.8 ± 19.5 and 3.4 ± 4.7 in the group of patients submitted to surgery and chemotherapy. A higher survival time was observed in patients submitted to surgery and had a low Ki67 index ($P=0.0488$) (Figure 4C). It was also observed a higher survival time for patients with low Ki67 index in the group of patients treated with chemotherapy ($P=0.0143$) (Figure 4D).

3.6. Matrix of multiple correlations

The multiple correlations analysis revealed a strong positive correlation of tumor stage and development of metastasis ($r=0.9597$). Thus, patients with higher stages were correlated with metastasis in different sites at the diagnosis. It was also observed a positive correlation between Claudin-5 protein expression and overall survival. On the

other hand, patients with higher Claudin-5 protein expression was also correlated with higher survival time ($r=0.4382$). Ki67 index presented a negative correlation with Claudin-5 protein expression ($r=0.4264$). The matrix of multiple correlations for all markers is shown in Figure 5.

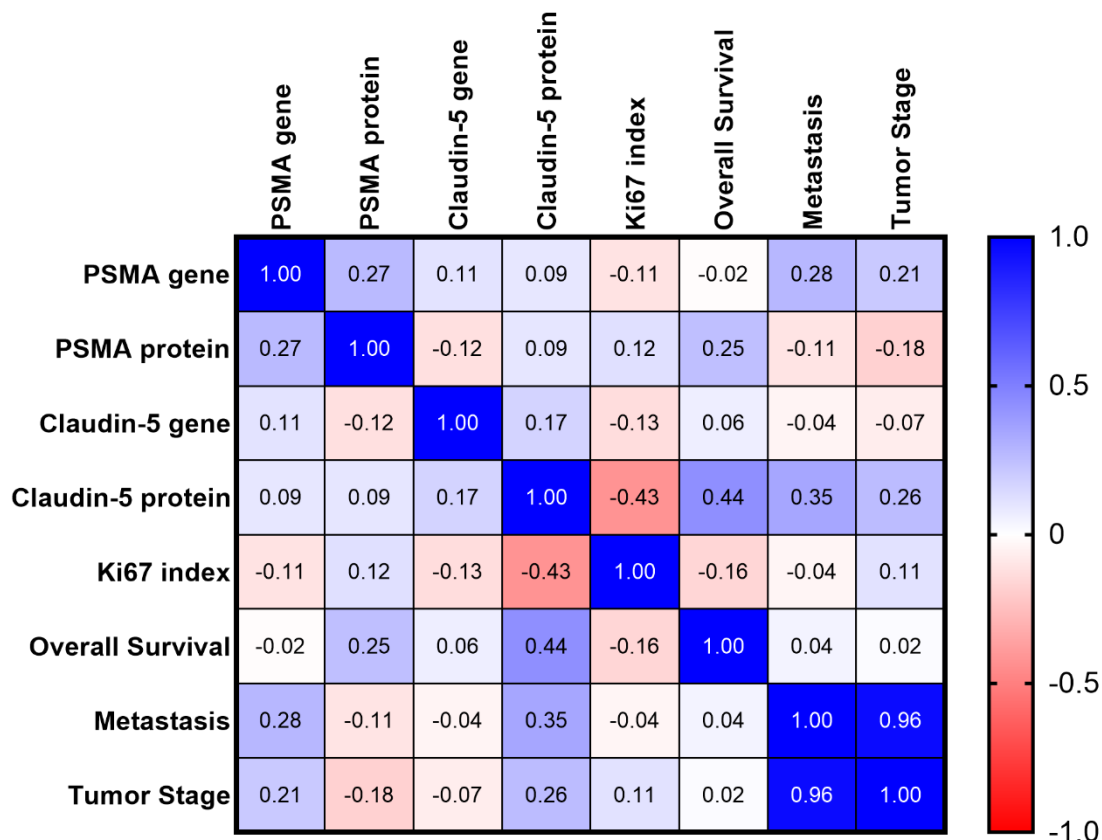


Figure 5. Matrix of multiple correlation for all studied markers. It is possible to observe a positive correlation in blue color and a negative correlation in red color. Strongest correlations are association with higher color intensity.

4. DISCUSSION

Canine hemangiosarcoma (HSA) it is a highly aggressive malignant neoplasm, originated from endothelial cells with a high metastatic rate and poor outcome. It is one of the most common and metastatic cancer in dogs⁽¹⁻⁵⁾. They affect middle-aged dogs to the elderly and there is a greater predisposition to affect males than females⁽¹⁻⁵⁾, in our study we confirm an average age of 10.7($\pm$ 2.0)years but females were more affected than males representing 79.24% of our samples. There was a prevalence of metastasis in 60.4% of cases and statistical difference with the liver and lungs being the most affected organs, corroborating with the literature^(5,7,10-13,23).

Splenic hemangiosarcoma is a malignant vascular neoplasm that has a fast-growing and highly metastatic characteristic⁽²⁴⁾. Our mean overall survival was 155.94 days (± 148.37) independent of treatment. Patients performed only surgery was 66% and had average survival of 128.83 days (± 118.84), patients who performed surgery and chemotherapy was 27% and had 262.43 days (± 243.53) and patients not received any treatment represented 7% with average 20.50 days (± 19.5) in overall survival also confirm with the literature^(2,5,25–28).

Regarding staging 58.9% of our cases had stage III, 28.30% with stage II and 13.21% with stage I, also showing a statistical difference and corroborating with the literature that the majority of splenic hemangiosarcomas present aggressively in stage III with decrease significant survival. The tumor staging is one of the most important prognostic factors for all subtypes of tumors and we showed a lower survival time in patients with stage III, compared with stages I and II. In our matrix of multiple correlations, we confirmed the importance of tumor stage to predict metastatic disease. This finding was widely provided by the previous literature^(1,2,5,23,29).

The previous literature reinforces that stage III tumors have a worst prognosis and patients with stages I and II are challenging^(29,30). Besides that, patients who underwent chemotherapy associated with surgery had a longer survival than those who just underwent surgery. Since chemotherapy has a direct impact in overall survival, we opted to analyze our overall survival data, grouping patients that performed only surgery and patients submitted for surgery associated with chemotherapy^(27,28,31). Due the retrospect aspect of our research, in the group of patients submitted to surgery and chemotherapy, we had different protocols applied. Among the protocols, it was selected patients treated with anthracycline-based chemotherapy and patients treated with metronomic cyclophosphamide. We grouped these patients because we had a low number of patients treated with chemotherapy and the previous literature had provided sufficient evidence to support this approach. Overall, there is no difference in overall survival in patients submitted to the anthracycline-based chemotherapy or metronomic cyclophosphamide^(27,28,31).

Claudin-5 is a protein member of the Claudin family may be directly or indirectly related to tumor motility and neovascularization and it facilitates metastasis and tumor progression because it is closely linked to the epithelial and endothelial cell^(17,32). We did not find association of *Claudin-5* gene expression and the evaluated parameters. On the other hand Claudin-5 protein was overexpressed in samples from patients with metastasis.

It was also observed an association of Claudin-5 expression with tumor stage mainly stage III. So, in more advanced stages of the disease and expression of Claudin 5 was more evident. Previously, the literature⁽¹⁷⁾ reports that the high expression of claudin 5 occurs mainly in solid and undifferentiated histological type. In our study, we found a high expression in the cavernous and differentiated histological subtype. It could be used as a new marker with greater sensitivity and could also be of a diagnostic value in the differential diagnosis of canine HSAs from other sarcomas with hemorrhages or increased vascularisation^(16,17,32–34).

Being able to be used as a diagnostic value, that is, a high expression of Claudin 5 we can consider as advanced disease with disseminated tumor progression and there are still not many studies related to claudin and hemangiosarcoma, but we can also leave a possibility for it to be a potential therapeutic target, by blocking the cellular permeability of the altered cell would be able to contain the tumor progression and its systemic dissemination.

According to the literature^(18,19) PSMA gene expression was predictive of cancer occurrence and metastasis development. In our study observed that there was a high PSMA gene expression in patients who had metastasis, stage III and cavernous histological type interestingly in samples whose patients underwent surgery and chemotherapy treatment had a longer survival with a low PSMA gene expression. Few studies are still in veterinary medicine which reports the correlation of PSMA and hemangiosarcoma, but some studies used ascitic fluid to obtain cells and had difficulty in gene amplification. Our study used tissue samples in paraffin blocks and obtained a better genetic amplification. Patients undergoing treatment for surgery or surgery associated with chemotherapy had a higher expectation of survival with a lower protein expression of PSMA. This reveals local and systemic disease control and decreased angiogenesis. So further studies are still needed to improve methods of sensitivity and specificity^(18,19,35).

AL thought Ki67 expression is widely used in canine tumor, we did not find previous studies evaluation Ki67 proliferative index in canine splenic HSA. In our study, high survival was correlated to patients who underwent at least one of the proposed treatments, thus their long survival was characterized by obtaining a low index of ki67. Previously, Moore et al.⁽²⁹⁾ studied 30 cases of canine HSA and identified a correlation of mitotic index with overall survival. Our immunohistochemical results demonstrated that patients submitted to one of the proposed treatments had a lower rate of proliferation by Ki67 have longer survival, the high rate of ki67 was found in a patient with stage II and solid and undifferentiated histological type, again corroborating the literature.

All markers studied demonstrated strong and efficient staining in patients who had metastasis, more advanced stages, with the cavernous type being the most affected due to its arrangement of vascular channels and the proliferative index accompanies tumor progression. Thus, we can propose that claudin-5, PSMA and ki67 could compose a prognostic panel for patients with HSA.

Overall, our study has confirmed that patients with stage III and metastatic disease present a poor prognosis. The adjuvant chemotherapy provides a higher overall survival for the patients and should indicated for all patients with splenic HSA.

ORCID

J Rozolen  <https://orcid.org/0000-0001-5441-1057>

C.E Fonseca-Alves  <https://orcid.org/0000-0002-6702-6139>

5. REFERENCES

1. Sorenmo KU, Baez JL, Clifford CA, Mauldin E, Overley B, Skorupski K, et al. Efficacy & toxicity of a dose-intensified doxorubicin protocol in K9 HSA. *J Vet Intern Med.* 2004;18:209–13.
2. Wendelburg KM, Price LL, Burgess KE, Lyons JA, Lew FH, Berg J. Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001–2012). *J Am Vet Med Assoc [Internet].* 2015 Aug 15;247(4):393–403. Available from: <http://avmajournals.avma.org/doi/10.2460/javma.247.4.393>
3. Mackin A, Henry CJ, Clifford CA, Mackin AJ, Henry CJ. Treatment of Canine Hemangiosarcoma : 2000 and Beyond Treatment of Canine Hemangiosarcoma : 2000 and Beyond. 2016;(2000):479–85.
4. LIPTAK J, DERNELL W, WITHROW S. Haemangiosarcoma of the urinary bladder in a dog. *Aust Vet J [Internet].* 2004 Apr;82(4):215–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-0813.2004.tb12679.x>
5. Batschinski K, Nobre A, Vargas-Mendez E, Tedardi M V., Cirillo J, Cestari G, et al. Canine visceral hemangiosarcoma treated with surgery alone or surgery and doxorubicin: 37 cases (2005-2014). *Can Vet J.* 2018;59(9):967–72.
6. Clifford CA, Mackin AJ, Henry CJ. Treatment of canine hemangiosarcoma: 2000 and beyond. Vol. 14, *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine.* 2000. p. 479–85.
7. Modiano JF, Ritt M, Breen M, Breen T. Canine Hemangiosarcoma - the Road From Despair To Hope. 2000;
8. Dahl K, Gamlem H, Tverdal A, Glatte E, Moe L. Canine vascular neoplasia--a population-based study of prognosis. *APMIS Suppl.* 2008;(125):55–62.
9. Kim J-H, Graef A, Dickerson E, Modiano J. Pathobiology of Hemangiosarcoma in Dogs: Research Advances and Future Perspectives. *Vet Sci.* 2015;2(4):388–405.
10. Moroz LR, Schweigert A. Hemangiossarcoma em cão- relato de casos. *Campo Digit.* 2007;
11. Barker DA, Foale RD, Holmes MA, Demetriou JL. Survey of UK-based veterinary surgeons' opinions on the use of surgery and chemotherapy in the treatment of canine high-grade mast cell tumour, splenic haemangiosarcoma and appendicular

osteosarcoma. *Vet Rec.* 2016;

12. Göritz M, Müller K, Krastel D, Staudacher G, Schmidt P, Kühn M, et al. Canine splenic haemangiosarcoma: Influence of metastases, chemotherapy and growth pattern on post-splenectomy survival and expression of angiogenic factors. *J Comp Pathol.* 2013 Jul;149(1):30–9.

13. Thamm DH, Dickerson EB, Akhtar N, Lewis R, Auerbach R, Helfand SC, et al. Biological and molecular characterization of a canine hemangiosarcoma-derived cell line. *Res Vet Sci.* 2006;81(1):76–86.

14. Wang G, Wu M, Maloneyhuss MA, Wojcik J, Durham AC, Mason NJ, et al. Actionable mutations in canine hemangiosarcoma. Toland AE, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Nov 30;12(11):e0188667. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0188667>

15. Morrow CMK, Mruk D, Cheng CY, Hess RA. Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium. Vol. 365, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society; 2010. p. 1679–96.

16. Greene C, Hanley N, Campbell M. Claudin-5: Gatekeeper of neurological function. Vol. 16, *Fluids and Barriers of the CNS*. BioMed Central Ltd.; 2019.

17. Jakab C, Halász J, Kiss A, Schaff Z, Rusvai M, Gálfi P, et al. Claudin-5 protein is a new differential marker for histopathological differential diagnosis of canine hemangiosarcoma. *Histol Histopathol.* 2009;24(7):801–13.

18. Dowling M, Samuelson J, Fadl-Alla B, Pondenis HC, Byrum M, Barger AM, et al. Overexpression of prostate specific membrane antigen by canine hemangiosarcoma cells provides opportunity for the molecular detection of disease burdens within hemorrhagic body cavity effusions. Thamm DH, editor. *PLoS One* [Internet]. 2019 Jan 2;14(1):e0210297. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0210297>

19. Chang SS, Reuter VE, Heston WDW, Bander NH, Grauer LS, Gaudin PB. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res* [Internet]. 1999 Jul 1;59(13):3192–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397265>

20. S.S. C, V.E. R, W.D.W. H, N.H. B, L.S. G, P.B. G. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res.* 1999;

21. Yang C, Zhang J, Ding M, Xu K, Li L, Mao L, et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. Vol. 20, *Clinical and Translational Oncology*. Springer-Verlag Italia s.r.l.; 2018. p. 570–5.

22. da Silva L, Fonseca-Alves CE, Thompson JJ, Foster RA, Wood GA, Amorim RL, et al. Pilot assessment of vascular endothelial growth factor receptors and trafficking pathways in recurrent and metastatic canine subcutaneous mast cell tumours. *Vet Med Sci.* 2017;

23. Dervisis NG, Dominguez PA, Newman RG, Cadile CD, Kitchell BE. Treatment with DAV for Advanced-Stage Hemangiosarcoma in Dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2011;

24. Moore AS, Rassnick KM, Frimberger AE. Evaluation of clinical and histologic factors associated with survival time in dogs with stage II splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy and adjuvant chemotherapy: 30 cases (2011–2014). *J Am Vet Med Assoc* [Internet]. 2017 Sep;251(5):559–65. Available from: <http://avmajournals.avma.org/doi/10.2460/javma.251.5.559>

25. Matsuyama A, Poirier VJ, Mantovani F, Foster RA, Mutsaers AJ. Adjuvant doxorubicin with or without metronomic cyclophosphamide for canine splenic hemangiosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2017 Nov 1;53(6):304–12.

26. Selting KA, Powers BE, Thompson LJ, Mittleman E, Tyler JW, Lafferty MH, et al. Outcome of dogs with high-grade soft tissue sarcomas treated with and without adjuvant doxorubicin chemotherapy: 39 cases (1996–2004) Kim. *JAVMA*. 2005;227(9):1442–8.
27. Marconato L, Chalfon C, Finotello R, Polton G, Vasconi ME, Annoni M, et al. Adjuvant anthracycline-based vs metronomic chemotherapy vs no medical treatment for dogs with metastatic splenic hemangiosarcoma: A multi-institutional retrospective study of the Italian Society of Veterinary Oncology. *Vet Comp Oncol*. 2019;
28. Treggiari E, Borrego JF, Gramer I, Valenti P, Harper A, Finotello R, et al. Retrospective comparison of first-line adjuvant anthracycline vs metronomic-based chemotherapy protocols in the treatment of stage I and II canine splenic haemangiosarcoma. *Vet Comp Oncol* [Internet]. 2020 Mar 13;18(1):43–51. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12548>
29. Moore AS, Rassnick KM, Frimberger AE. Evaluation of clinical and histologic factors associated with survival time in dogs with stage II splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy and adjuvant chemotherapy: 30 cases (2011–2014). *J Am Vet Med Assoc*. 2017 Sep 1;251(5):559–65.
30. Treggiari E, Borrego JF, Gramer I, Valenti P, Harper A, Finotello R, et al. Retrospective comparison of first-line adjuvant anthracycline vs metronomic-based chemotherapy protocols in the treatment of stage I and II canine splenic haemangiosarcoma. *Vet Comp Oncol*. 2019;
31. Story AL, Wavreille V, Abrams B, Egan A, Cray M, Selmic LE. Outcomes of 43 small breed dogs treated for splenic hemangiosarcoma. *Vet Surg*. 2020;
32. Escudero-Esparza A, Jiang WG, Martin TA. Claudin-5 participates in the regulation of endothelial cell motility. *Mol Cell Biochem*. 2012;362(1–2):71–85.
33. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Wang Z-F. Claudin-5 as an Immunohistochemical Marker for Angiosarcoma and Hemangioendotheliomas. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2011 Dec;35(12):1848–56. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000478-201112000-00012>
34. Morrow CMK, Mruk D, Cheng CY, Hess RA. Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010.
35. Tang L, Tong R, Coyle VJ, Yin Q, Pondenis H, Borst LB, et al. Targeting Tumor Vasculature with Aptamer-Functionalized Doxorubicin–Polylactide Nanoconjugates for Enhanced Cancer Therapy. *ACS Nano* [Internet]. 2015 May 26;9(5):5072–81. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.5b00166>