



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

**Estudo retrospectivo: Fatores associados à sobrevivência em
cães com hemangiossarcoma esplénico**

Rita Isabel das Neves Rocha

Orientador(es) | Nuno Miguel Lourenço Alexandre
Joana Catarina Cardoso Dias
Maria Dias

Évora 2022



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

**Estudo retrospectivo: Fatores associados à sobrevivência em
cães com hemangiossarcoma esplênico**

Rita Isabel das Neves Rocha

Orientador(es) | Nuno Miguel Lourenço Alexandre
Joana Catarina Cardoso Dias
Maria Dias

Évora 2022



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Rita Payan-Carreira (Universidade de Évora)

Vogais | Joaquim J. Garcia Pereira Henriques (Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, EPE) (Arguente)
Nuno Miguel Lourenço Alexandre (Universidade de Évora) (Orientador)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a toda a equipa do Centro Hospitalar Veterinário do Porto, pelos seis meses maravilhosos que passei nessa bela cidade e por tudo o que me transmitiram e ensinaram. Levo comigo a lembrança de uma equipa sempre disposta a ajudar, ensinar e sempre pronta para dar aos nossos animais o melhor cuidado, com todo o seu profissionalismo, sendo por isso um orgulho poder ter estes profissionais como parte do meu próprio caminho académico e de aprendizagem. Agradecimentos especiais para o doutor Hugo Gregório, que proporcionou o tema desta dissertação e da minha orientadora externa do CHV, a doutora Joana Cardoso que sempre se dispôs a ajudar no decorrer deste trabalho. Não posso deixar de relembrar a importância das minhas colegas de estágio durante esses meses tão importantes. Não esquecerei todos os momentos passados, amizades criadas e aprendizagens retidas.

Agradeço toda a ajuda do meu orientador da Universidade de Évora, doutor Nuno Alexandre, sempre disponível desde o início, desde a escolha do estágio, à escolha do tema de dissertação, para não falar das situações de maior confusão e desorientação que por vezes acompanharam este trabalho. Ficarei sempre grata pelos seus conselhos e por poder aprender com alguém que admiro enquanto profissional.

Quanto à família não são suficientes as palavras que expressam o agradecimento que tenho. Um agradecimento especial aos meus pais, Sara Neves Rocha e Francisco Rocha, bem como à minha irmã, Leonor Rocha. São uma família incansável, não faltando apoio nos bons e maus momentos, mantendo o lema de que o esforço e trabalho árduo compensam sempre no final.

Também aos amigos que encontrei na Universidade de Évora agradeço por todos estes anos, que bem poderão ser os melhores anos da nossa vida. Recordarei todos com grande carinho. Um especial agradecimento ao meu querido amigo Pedro Valentim Félix, que durante estes seis anos tem sido o meu braço direito. Um agradecimento também à minha colega e amiga Sara Santos, que tanto nos ajudou ao longo destes tempos, sendo incansável sempre que alguém precisava de ajuda.

Não posso deixar de agradecer à doutora Inês Torrado e à enfermeira Sophie Waldbillig, que nos últimos tempos têm sido um apoio muito precioso. Aprecio todos os ensinamentos que me têm dado.

Um obrigada também muito especial aos pais do meu namorado, Rosa Rato e João Paulo Rato, que em dias menos bons estiveram lá para me erguer, sempre presentes quando precisei.

Por fim, mas não menos importante, o maior dos agradecimentos ao meu namorado, João Daniel Rato, que do início ao fim tem sido a minha ajuda constante, em todos os momentos. Sem ti a realização desta dissertação não teria sido possível. Não consigo agradecer o suficiente pelo apoio em todas as situações e mais algumas. Em parte, penso que contribui para que ganhasses

um gosto pelo que é a Medicina Veterinária e espero que isso possa de algum modo contribuir para o teu futuro.

Não foi fácil, mas nenhum caminho fácil é aquele que valha a pena seguir. Obrigada a todos!

Índice

Agradecimentos	1
Índice de tabelas.....	6
Índice de figuras	8
Resumo	11
Abstract.....	12
I. Revisão Bibliográfica.....	13
1.Hemangiossarcoma canino.....	13
1.1. O que é o hemangiossarcoma?.....	13
1.2. Etiologia	13
1.3. Microambiente tumoral e ontogênese	15
1.4. Incidência	17
1.5. Fatores de risco	18
1.5.1. Luz ultravioleta	18
1.5.2. Genética e Raça.....	18
1.5.3. Sexo, idade e peso.....	18
1.5.4. Tipo sanguíneo	19
2. Diagnóstico	19
2.1. Histopatologia e citologia.....	20
2.2. Análises laboratoriais.....	21
2.3. Diagnóstico por imagem	22
2.4. Biomarcadores	23
3. Terapêutica.....	24
3.1 Abordagem cirúrgica	24
3.1.1. Esplenectomia completa por laparotomia.....	24
3.1.2 Esplenectomia laparoscópica.....	25
3.1.3 Complicações da esplenectomia	25
3.2 Quimioterapia	26
3.2.1 Quimioterapia metronômica Vs Quimioterapia convencional	26
3.2.2 Fármacos	27
3.2.2.1 Doxorrubicina	27
3.2.2.2 Carboplatina	27
3.2.2.3 Ciclofosfamida.....	28
3.2.2.4 Clorambucil	28

3.3 Outras alternativas terapêuticas	29
3.3.1 Radioterapia.....	29
3.3.2 Imunoterapia.....	29
4.Prognóstico	30
II. Objetivos da dissertação	32
III. Materiais e Métodos	33
1. Recolha de dados.....	33
2. Variáveis em estudo	34
3. Análise estatística	34
IV. Resultados	35
1. Estatística descritiva	35
1.1. Caracterização da amostra em estudo	35
1.2. Caracterização da apresentação clínica	38
1.3. Caracterização da terapêutica	42
2. Análise estatística	43
2.1. Sexo	43
2.2. Raça	44
2.3. Idade	45
2.4. Peso	46
2.5. Tipo de Sangue	47
2.6. Hemograma.....	48
2.7. Hemoabdómen.....	51
2.8. Transfusão	52
2.9. Quimioterapia.....	53
2.10. Interação entre Peso, Raça, Tipo de Sangue e Quimioterapia.....	56
V. Discussão.....	57
1. Influência de fatores intrínsecos ao próprio animal	57
1.1. Sexo	57
1.2. Raça	58
1.3. Idade e Peso	59
1.4. Tipo sanguíneo	60
2. Influência das apresentações clínicas	61
2.1. Hemoabdómen.....	61
2.2. Hemograma.....	62

3. Influência da terapêutica	64
3.1. Transfusão	64
3.2. Quimioterapia	64
4. Influência conjunta da raça, peso e quimioterapia	66
5. Limitações	67
VI. Conclusão	69
VII. Bibliografia.....	71

Índice de tabelas

Tabela 1- Sistema de estadiamento clínico do hemangiossarcoma canino (TMN), segundo Mullin & Clifford (2019).....	20
Tabela 2- Tempos médios de sobrevivência, em dias, dos diversos tratamentos encontrados na bibliografia. O * refere estudos que apenas utilizaram um animal. Cx- cirurgia; Dox- Doxorubicina; Carbo- Carboplatina; Ciclo- Ciclofosfamida; Cox2- Anti-inflamatório não esteróide inibidor da cicloxigenase 2; Clora- Clorambucil; PSP- Polissacaridopeptido.....	32
Tabela 3- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazard Ratio da variável Sexo. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazard Ratio. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor padrão. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.....	43
Tabela 4- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Raça. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor padrão. Os valores significativos encontram-se assinalados por *. SRD- cães sem raça definida que incluem cães cruzados e cães sem registo da raça.	45
Tabela 5- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio das variáveis Idade e Peso. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor com menos uma unidade (menos 1 ano ou 1kg). Os valores significativos encontram-se assinalados por *.....	46
Tabela 6- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Tipo de Sangue. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Rati; p-valor de significância o. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *. Positivo- Tipo sanguíneo DEA 1 positivo e Negativo- tipo sanguíneo DEA 1 negativo.	47
Tabela 7- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio das variáveis WBC, Lym, HCT, PLT, HGB e RBC. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.....	51
Tabela 8- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Hemoabdómen. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de	

morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *..... 52

Tabela 9- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Transfusão. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.
..... 53

Tabela 10- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Quimioterapia. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.
..... 54

Tabela 11- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Quimioterapia sem o tratamento Sx tratamento (apenas cirurgia). M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.
..... 55

Tabela 12- Resultado da análise multivariada de sobrevivência Cox Hazards Ratio das variáveis Peso, Raça e Quimioterapia. M- Número de animais mortos; p- valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.
..... 57

Índice de figuras

Figura 1- Mobilização, recrutamento e diferenciação de células progenitoras angiogénicas derivadas da médula óssea em humanos. Demonstra o envolvimento dos marcadores descritos no parágrafo acima, nas diferentes fases de desenvolvimento desde das células da médula óssea até as células endoteliais maduras (adaptado de Hristov & Weber, 2004).....	14
Figura 2- Distribuição dos sexos de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico, submetidos a esplenectomia. F- Denomina as fêmeas e M- denomina os machos.	35
Figura 3- Distribuição das raças de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico, submetidos a esplenectomia. SRD- Sem raça definida.....	36
Figura 4- Distribuição da idade, em anos, de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico, submetidos a esplenectomia.	36
Figura 5- Distribuição dos pesos, em kg, de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico, submetidos a esplenectomia.	37
Figura 6- Distribuição dos tipos de sangue de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico, submetidos a esplenectomia. Foi classificado como “Sem Registos” todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas. Positivo- animais com tipo sanguíneo DEA 1 positivo; Negativo- Animais com tipo sanguíneo DEA 1 negativo.....	37
Figura 7- Distribuição do estado de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico, submetidos a esplenectomia.....	38
Figura 8- Distribuição da presença de hemoabdómen de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico, submetidos a esplenectomia. Foi classificado como “Sem Registos” todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas. Sim- Presença de hemoabdómen; Não- Ausência de hemoabdómen.....	38
Figura 9- Distribuição da contagem de leucócitos de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico, submetidos a esplenectomia. Normal: 6.00-17.00; Leucocitose: >17.00 e Leucopénia: <6.00. Medido em $10^9/L$. Foi classificado como “Sem Registos” todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas.	39
Figura 10- Distribuição da contagem de linfócitos de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico, submetidos a esplenectomia. Normal: 0.83-4.91; Linfocitose: >4.91 e Linfopénia: <0.83. Medido em $10^9/L$. Foi classificado como “Sem	

Registos” todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas.	39
Figura 11- Distribuição da contagem de monócitos de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Normal: 0.14-1.97 e Monocitose: >1.97. Medido em $10^9/L$. Foi classificado como “Sem Registos” todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas.....	40
Figura 12- Distribuição dos parâmetros relativos aos eritrócitos de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. RBC- contagem de eritrócitos; HTC- hematócrito; HGB- hemoglobina. Para RBC, Normal: 5.10-8.50; Alto: >8.50 e Baixo: <5.10 (medido em $10^{12}/L$). Para HTC, Normal: 0.330-0.560; Alto: >0.560 e Baixo: <0.330. Para HGB, Normal: 110-190; Alto: >190 e Baixo: <110 (medido em g/L). Foi classificado como “Sem Registos” todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas.	41
Figura 13- Distribuição da contagem de plaquetas de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Normal: 117-490; Trombocitose: >490 e Trombocitopenia: <110. Medido em $10^9/L$. Foi classificado como “Sem Registos” todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas.	41
Figura 14- Distribuição da realização de transfusão sanguínea de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Foi classificado como “Sem Registos” todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas. Sim- Realização de transfusão sanguínea; Não- Não realização de transfusão sanguínea.	42
Figura 15- Distribuição do protocolo quimioterapêutico realizado em cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Foi classificado como “Sx tratamento” todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas. Ciclo- ciclofosfamida; Cox2- anti-inflamatório não esteroide inibidor da cicloxigenase 2; Clora- clorambucil; Dox- doxorubicina; Carbo- Carboplatina e Nenhum- apenas esplenectomia.....	43
Figura 16- Curvas de sobrevivência da variável Sexo. M- Macho e F-Fêmea.....	44
Figura 17- Curvas de sobrevivência da variável Raça. SRD- cães sem raça definida que incluem cães cruzados e cães sem registo da raça.	45
Figura 18- Representação gráfica da tendência linear da Sobrevivência, em dias, com a variação da Idade, em anos.....	46

Figura 19- Representação gráfica da tendência linear da Sobrevivência, em dias, com a variação do Peso, em kg.....	47
Figura 20- Curvas de sobrevivência da variável Tipo de Sangue. Positivo- Tipo sanguíneo DEA 1 positivo e Negativo- tipo sanguíneo DEA 1 negativo.	48
Figura 21- Curvas de sobrevivência da variáveis WBC, Lym, HCT e PLT. Para WBC, Normal: 6.00-17.00; Leucocitose: >17.00 e Leucopénia: <6.00. Para Lym, Normal: 0.83-4.91; Linfocitose: >4.91 e Linfopénia: <0.83. Para HTC, Normal: 0.330-0.560; Alto: >0.560 e baixo: <0.330. Para PLT, Normal: 117-490; Trombocitose: >490 e Trombocitopénia: <110. WBC, Lym e PLT medidos em 10 ⁹ /L. HTC medido em g/L. ...	49
Figura 22- Curvas de sobrevivência da variáveis HGB e RBC. Para HGB, Normal: 110-190; HGB alta: >190 e HGB baixa: <110. Para RBC, Normal: 5.50-8.50; RBC alto: >8.50 e RBC baixo: <5.50. HGB medido em g/L e RBC medido em 10 ¹² /L.	50
Figura 23- Curvas de sobrevivência da variável Hemoabdómen. Sim- Presença de hemoabdómen e Não- ausência de hemoabdómen.....	52
Figura 24- Curvas de sobrevivência da variável Transfusão. Sim- Realização de transfusão sanguínea e Não- ausência de transfusão sanguínea.	53
Figura 25- Curvas de sobrevivência da variável Quimioterapia. Ciclo- ciclofosfamida; Cox2- anti-inflamatório não esteroide inibidor da cicloxigenase 2; Clora- clorambucil; Dox- doxorubicina; Carbo- carboplatina e Sx tratamento- apenas esplenectomia.	54
Figura 26- Curvas de sobrevivência da variável Quimioterapia. Ciclo- ciclofosfamida; Cox2- antinflamatório não esteroide inibidor da cicloxigenase 2; Clora- clorambucil; Dox- doxorubicina e Carbo- carboplatina.	56

Resumo

Estudo retrospectivo: Fatores associados à sobrevivência em cães com hemangiossarcoma esplênico

O hemangiossarcoma (HSA) é uma neoplasia maligna de mau prognóstico, comum de ser encontrada no baço de cães. A abordagem terapêutica baseia-se na cirurgia, podendo ser complementada com protocolos quimioterapêuticos adjuvantes.

O objetivo deste estudo foi identificar os fatores que podem afetar a sobrevivência de cães com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Neste estudo foi realizada uma análise estatística Cox hazards ratios, com uma amostra de 38 cães diagnosticados com HSA esplênico, submetidos a esplenectomia.

Pode ser concluído que os principais fatores que influenciam a sobrevivência de animais com hemangiossarcoma esplênico são: a raça, o peso, o tipo sanguíneo e o protocolo de quimioterapia utilizado. Quando considerada a análise multivariada, verifica-se que apenas a raça e o protocolo quimioterapêutico têm influência no tempo de sobrevivência. Contudo, esta análise foi condicionada, devido ao número reduzido de animais em estudo, pelo que os seus resultados devem ser interpretados com alguma cautela.

Palavras-chave: Hemangiossarcoma; Prognóstico; Animais de companhia; Oncologia; Baço.

Abstract

Retrospective study: Factors associated with survival in dogs with splenic hemangiosarcoma

Hemangiosarcoma (HSA) is a malignant neoplasia with poor prognosis, commonly found in dog's spleen. The therapeutic approach is based on surgery and might be complemented by adjuvant chemotherapy.

The main goal of this study was finding out which factors might influence the survival of dogs with splenic hemangiosarcoma, submitted to splenectomy. In this study a statistical analysis Cox hazards ratio was conducted with a 38 animals sample size, all of these diagnosed with splenic hemangiosarcoma, submitted to splenectomy.

In conclusion, the main factors that might influence survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma are: breed, weight, blood type and chemotherapy protocol. When a multivariable analysis is considered only breed and chemotherapy remain as survival time influencers. However, a small sample size conditioned this analysis, thus, results must be interpreted with caution.

Keywords: Hemangiosarcoma; Prognosis; Companion Animals; Oncology; Spleen.

I. Revisão Bibliográfica

1. Hemangiossarcoma canino

1.1. O que é o hemangiossarcoma?

O hemangiossarcoma (HSA), também conhecido como hemangioendotelioma maligno ou angiossarcoma, é caracterizado como um tumor maligno localmente invasivo e de crescimento rápido, originado a partir de precursores das células endoteliais na medula óssea (Smith, 2003; Mullin & Clifford, 2019). Este tumor é mais frequente em cães comparativamente a qualquer outra espécie doméstica e o seu comportamento irá depender muito do local em que ocorre (Mullin & Clifford, 2019). Podemos ter então hemangiossarcoma a nível visceral ou hemangiossarcoma a nível da derme, tendo este último, em geral, um prognóstico mais favorável, do que o seu aparecimento a nível visceral (Mullin & Clifford, 2019). A nível da derme são reconhecidas duas formas: 1) HSA induzido por radiação solar, afetando animais com pelagem mais curta e clara, tendo melhor prognóstico e 2) HSA não induzido por radiação solar, sendo este mais agressivo e afetando animais de pelagem maior, normalmente em regiões não ventrais (Oakley & Chretin, 2020). O hemangiossarcoma visceral tem uma elevada capacidade metastática, levando a que grande parte dos animais que se apresentam a consulta já apresentem disseminação por outros órgãos (Smith, 2003). A exceção a esta regra será o HSA que se encontra a nível da derme, que tem uma taxa metastática mais baixa (Oakley & Chretin, 2020).

O conhecimento da etiologia do hemangiossarcoma e como atuar para aumentar a sobrevivência dos animais que este afeta ainda é desconhecido. Com esta dissertação pretende-se contribuir para o conhecimento desta doença oncológica, principalmente e sempre que possível, no que toca ao hemangiossarcoma a nível esplénico, devido ao seu conteúdo altamente celular e vascular, que poderá proporcionar as condições ideais para a formação desta neoplasia.

1.2. Etiologia

A origem do hemangiossarcoma tem por base duas teorias, a primeira refere que este tem origem em células maduras (fase pós angioblasto) da linhagem endotelial dos vasos sanguíneos e a segunda baseia a ontogénese deste tumor em células ainda não diferenciadas, ou seja, células estaminais multipotentes derivadas da medula óssea, que se encontram na fase de compromisso endotelial ou próximo desta (hemangioblasto) (Lamerato-Kozicki et al., 2006).

As células endoteliais maduras têm pouca capacidade de proliferação e diminuta capacidade de substituição daquelas que se encontram lesionadas e por isso existem em circulação células progenitoras derivadas da medula óssea, as células precursoras endoteliais (EPCs), semelhantes a hemangioblastos embrionários, com a capacidade de se diferenciarem em células endoteliais maduras e reparar esse mesmo endotélio lesionado (Hristov & Weber, 2004). Assim sendo, começou a ser plausível a ideia de que células precursoras endoteliais

(EPCs) pudessem migrar para estes locais vasculares, a partir da medula óssea, e serem em parte responsáveis pela formação deste tumor (Lamerato-Kozicki et al., 2006). É a ligação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ao recetor VEGFR-2 que permite esta mobilização, permitindo que a célula hemangioblasto progrida para a fase de angioblasto e por fim para célula precursora endotelial, passível de ser encontrada em circulação através de métodos mais sensíveis (Lamerato-Kozicki et al., 2006).

Ao longo da sua diferenciação, desde hemangioblasto até EPCs, as células vão expressando diferentes marcadores à sua superfície, permitindo estudar a evolução destas mesmas células (figura 1) e conhecer qual das teorias acima descritas será mais plausível (Fosmire et al., 2004; Hristov & Weber, 2004; Lamerato-Kozicki et al., 2006). O marcador CD117 (c-Kit), recetor do fator de células estaminais, é expresso em células estaminais hematopoiéticas, bem como em células hematopoiéticas primitivas, não estando presente nas células endoteliais maduras (Fosmire et al., 2004). Fosmire et al. (2004) demonstram que o marcador C-kit está presente apenas em amostras de baço de animais com hemangiossarcoma, não aparecendo em lesões benignas como os hemangiomas, pois a origem destas é proveniente de células endoteliais maduras, não contendo o referido marcador C-kit. Esta diferença entre lesões benignas e o HSA vem fundamentar a origem desta neoplasia a partir destas células estaminais pouco diferenciadas da medula óssea. Descobriu-se também que marcadores endoteliais, como CD31 e fator von willebrand (vWF), permitem confirmar a origem celular do HSA, podendo ajudar no seu diagnóstico (Fosmire et al., 2004).

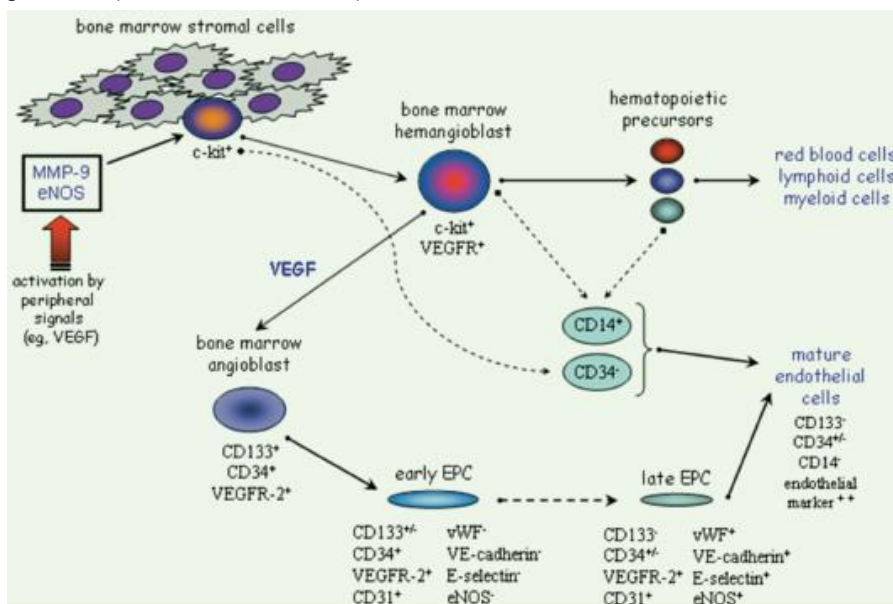


Figura 1- Mobilização, recrutamento e diferenciação de células progenitoras angiogénicas derivadas da medula óssea em humanos. Demonstra o envolvimento dos marcadores descritos no parágrafo acima, nas diferentes fases de desenvolvimento desde das células da medula óssea até as células endoteliais maduras (adaptado de Hristov & Weber, 2004).

A maior parte dos tumores são classificados de acordo com o seu aspeto histopatológico, permitindo reconhecer as suas células de origem (Gorden et al., 2014). Porém, no caso dos sarcomas existe uma heterogeneidade bastante acentuada, não permitindo identificar a sua

célula progenitora (Gorden et al., 2014). No estudo de Gorden et al. (2014) foi possível identificar três subtipos moleculares diferentes de hemangiossarcoma de acordo com o seu genótipo, que favorecem diferentes processos metabólicos: grupo 1 associado à angiogênese, grupo 2 associado à inflamação e grupo 3 associado à adipogênese. Uma célula progenitora poderá dar origem aos três diferentes fenótipos moleculares dependendo do processo adaptativo que ocorre no seu desenvolvimento (Gorden et al., 2014). Kim et al. (2021) conseguiram ainda subdividir os animais com fenótipo predominantemente angiogénico em 2 grupos diferentes: 1) HSA com características puramente angiogénicas e aqueles com 2) características angiogénicas e inflamatórias. Isto corrobora a teoria acima referida, em que uma célula progenitora comum tem a capacidade de se diferenciar em diversas linhagens, que culminam na formação dos vários subtipos de hemangiossarcoma (Gorden et al., 2014). Mais recentemente, Kim et al. (2021) indicam que estes diferentes subtipos de HSA podem ter implicações na sobrevivência dos animais, indicando que os animais com hemangiossarcoma do tipo inflamatório tendem a ter um tempo de sobrevivência mais prolongado. Mais ainda, nesse mesmo estudo, referem que os animais com hemangiossarcoma do tipo puramente angiogénico têm menores tempos de sobrevivência (Kim, 2021).

Assim, através dos estudos anteriores, que identificaram a expressão genética à superfície das células (Fosmire et al., 2004; Lamerato-Kozicki et al., 2006) e que utilizaram perfis de expressão genómica das células tumorais para identificar subtipos deste tumor (Gorden et al., 2014) vai sendo possível entender melhor a sua origem (Kim et al., 2015). Estes mesmos estudos permitiram obter o conhecimento de que células de hemangiossarcoma, em cultura, têm características fenotípicas que permitem afirmar a origem a partir de células estaminais da medula óssea (Kim et al., 2015).

1.3. Microambiente tumoral e ontogénese

Para que haja crescimento, proliferação e desenvolvimento tumoral é necessário que haja uma interação entre as células tumorais e o local em que se encontram (Kim et al., 2015). Estas mesmas células têm que estimular alterações físicas, moleculares e celulares a nível dos tecidos para suportar o seu constante crescimento (Anderson & Simon, 2020). O microambiente tumoral é essencial pois contém componentes tanto celulares, como não celulares, que permitem o crescimento tumoral, o seu desenvolvimento e metastização (Kim et al., 2021). Sabe-se que existem nichos de células hematopoiéticas neste microambiente tumoral e mais recentemente descobriu-se que células tumorais conseguem sinalizar a estes mesmos nichos, para que haja constante proliferação e renovação celular. (Ferraro et al., 2010; Kim et al., 2021).

No caso do hemangiossarcoma é conhecido que a inflamação e a angiogénese têm um grande papel na sua patogénese (Tamburini et al., 2010). As células neoplásicas apresentam recetores à sua superfície que permitem a ligação de citocinas com importância para o desenvolvimento e evolução neoplásica como a 1) interleucina-8, que promove um ambiente

tumoral reativo com alterações a nível da coagulação, inflamação e fibrose, 2) fator 1 derivado das células estromais (CXCL12) e o seu recetor-4 (CXCR4), que desempenham um papel na migração de células hematopoiéticas multipotentes, bem como migração de células tumorais e 3) esfingosina-1-fosfato, cuja atividade se foca não só na homeostasia vascular e imune, como contribui também para o crescimento neoplásico (Kim et al., 2014, 2015). Também, no estudo de Tamburini et al. (2010) foi possível demonstrar que genes que codificam para o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), inibidor 1 da metalopeptidase (TIMP-1), fibronectina (FN-1), proteína 9 que contém o domínio desintegrina e metaloproteinase (ADAM9), fator de crescimento c derivado de plaquetas (PDGFC), metaloproteinase-14 da matriz (MMP14), fator de necrose tumoral (TNF α) e ceramidase se encontram mais elevados em animais com hemangiossarcoma do que noutro tipo de tumor. Este perfil genómico permite clarificar o quão importante são as vias inflamatórias e angiogénicas para a patogénese tumoral, pois são estes genes que permitem que haja sinalização e ciclo celular, regulação a nível do metabolismo das células, interação entre estas, para além de permitirem a sobrevivência e apoptose, angiogénese, transcrição e respostas imunes (Tamburini et al., 2010). Assim, as vias de respostas relativas à inflamação, hipoxia, crescimento celular maligno e angiogénese irão estar alteradas e todo o microambiente criado será propício ao desenvolvimento do HSA (Tamburini et al., 2010; Kim et al., 2015).

Ainda, a interação com componentes não celulares, como por exemplo o ácido hialurónico permite a manutenção do microambiente tumoral propício para o desenvolvimento neoplásico (Kim et al., 2015).

Como mencionado anteriormente, uma das bases da patogénese deste tumor poderá ser a desregulação a nível da via angiogénica (Dickerson et al., 2005; Mullin & Clifford, 2019) e alguns estudos evidenciaram que fatores angiogénicos como VEGF (fator de crescimento do endotélio celular), bFGF (Fator de crescimento básico de fibroblasto), PDGF (fator de crescimento de derivado-plaquetário) e endotelina-1 encontram-se em elevadas quantidades no sangue e efusões de animais com HSA e ainda reportam uma maior expressão dos seus recetores à superfície das células tumorais (Clifford et al., 2000; Yonemaru et al., 2006; Kodama et al., 2009; Göritz et al., 2013; Abou Asa et al., 2015). Mais ainda, um estudo recente indica que a infeção de cães por *Bartonella* spp. pode induzir a angiogénese e inflamação crónica por aumentar a produção do fator VEGF, culminando na formação de doenças neoplásicas, em particular o HSA (Lashnits et al., 2020). No entanto, uma limitação deste estudo deve-se ao facto de ausência de um grupo controlo, que não permite comparar a incidência de *Bartonella* spp. em cães com HSA e cães saudáveis (Lashnits et al., 2020).

Por fim, mutações a nível do gene PTEN, que codifica para a fosfatase homóloga à tensina, pode ter algum peso quando falamos da patogénese deste tumor (Dickerson et al., 2005). PTEN é um gene supressor de tumor, cuja atividade inibe a proliferação celular e

apoptose, bem como inibição da migração celular e angiogênese, ao regular a expressão do gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Dickerson et al., 2005). A via da Fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) promove crescimento e sobrevivência celular, porém esta via é antagonizada pela atividade do produto do gene PTEN, que é inexistente ou encontra-se alterada em animais com hemangiossarcoma, levando à elevada metastização e continuo crescimento e desenvolvimento a nível dos tumores endoteliais vasculares (Dickerson et al., 2005). Outro estudo permitiu ainda a descoberta de que PTEN regula outras proteínas como a proteína quinase dependente de fosfoinositida (PDK-1) e a proteína quinase N (PKN), cuja função regula a migração celular (Dickerson et al., 2005; Lim et al., 2004).

1.4. Incidência

Esta neoplasia pode ocorrer em qualquer local que contenha vasos sanguíneos, sendo mais comum o seu aparecimento primário no baço (50%-65%), como local de eleição, o átrio direito do coração (3%-25%), a pele (13%-17%) e o fígado (5-6%) (Smith, 2003; Kim et al., 2015; Mullin & Clifford, 2019). O baço é um órgão altamente celular e vascular, que participa em diversas funções fisiológicas, nomeadamente hematopoiese extramedular e atividades relativas ao sistema imune, podendo, assim, estar predisposto a um desenvolvimento proliferativo, nomeadamente formação de espaços vasculares formados por células endoteliais imaturas de aspeto pleomórfico, com sangue e coágulos sanguíneos no seu interior (Dos Anjos et al., 2016; Fan, 2021). Para além dos locais anteriormente mencionados, foi relatado ainda o seu aparecimento em locais como o rim, espaço retroperitoneal, músculo, osso, olho, cavidade oral, cavidade nasal, bexiga, pulmão, mesentério, omento, vulva/vagina e intestino (Mullin & Clifford, 2019; Smith, 2003). É relatado o aparecimento prematuro de metástases microscópicas nesta doença, que ocorrem tanto por via hematogénea para outros órgãos, como por contiguidade após rutura do tumor, ocorrendo sementeira de células tumorais (Clifford et al., 2000; Mullin & Clifford, 2019; Das et al., 2021). Cerca de 80% dos animais que chegam à clínica já apresentam metástases no momento do diagnóstico (Smith, 2003). Os locais mais comumente afetados por metastização tumoral são o fígado, omento, mesentério e pulmões (Smith, 2003; Mullin & Clifford, 2019).

A espécie mais acometida por este tipo de tumor é o cão, tendo um peso de 2% de todos os tumores reportados para esta espécie (Mullin & Clifford, 2019), representando, no entanto, cerca de 51-66% de todas as neoplasias esplénicas (Das et al., 2021). São vários os estudos que referem a “regra dos dois terços”, explicando que aproximadamente dois terços dos tumores caninos raturados são malignos, e que destes, cerca de dois terços são HSA (Mullin & Clifford, 2019).

As raças com maior registo e predisposição para este tumor são o Pastor Alemão, o Labrador e o Golden Retriever (Tamburini et al., 2010; Batschinski et al., 2018; Mullin & Clifford,

2019; Das et al., 2021). Sabe-se ainda que os animais mais comumente afetados têm uma idade que ronda os 10 anos, em média (Kim et al., 2015; Mullin & Clifford, 2019).

1.5. Fatores de risco

Ainda não se sabe, em concreto, quais as causas para o aparecimento de hemangiossarcoma canino, porém sabe-se que existem alguns fatores de risco para o aparecimento deste tumor (Mullin & Clifford, 2019).

1.5.1. Luz ultravioleta

Um desses fatores de risco é sem dúvida a exposição à luz UV, que está relacionada com o aparecimento de hemangiossarcoma cutâneo, principalmente em animais de pelagem mais curta e clara, como é o caso de raças como whippets e greyhounds (Mullin & Clifford, 2019).

1.5.2. Genética e Raça

Vários estudos têm investigado o papel da genética no aparecimento de HSA. Para que as vias de crescimento e divisão celular tenham um bom funcionamento é necessário um trabalho conjunto de promotores e inibidores de crescimento (Yonemaru et al., 2007). É, portanto, de extrema importância o balanço entre os genes supressores de tumor, que inibem a proliferação e promovem a morte celular e os proto-oncogenes que permitem a sobrevivência, crescimento e proliferação das células (Yonemaru et al., 2007). Um estudo refere que no HSA existe deleção e mutações que levam à inativação do gene supressor de tumor (PTEN) (Dickerson et al., 2005). Outros estudos demonstram uma expressão aumentada de certas proteínas com função de regulação celular, como pRB, Ciclina D1, Bcl2 e survivina (Murakami et al., 2008; Yonemaru et al., 2007). Num estudo recente de Davies & Taylor (2020), foram formados grupos contendo algumas raças consoante a sua proximidade genética e chegaram à conclusão que o grupo contendo as raças pastor alemão, cão de água português, *dobermann* e *pinscher* apresentou maior nível de incidência de hemangiossarcoma, a que os autores atribuem ao elevado número de pastores alemães nesse grupo. Já os grupos contendo terriers, braquicéfalos, spaniels, poodles, dachshunds e beagles apresentaram uma baixa incidência de HSA (Davies & Taylor, 2020). Assim, a raça é um fator importante quando consideramos o diagnóstico de hemangiossarcoma (Davies & Taylor, 2020).

1.5.3. Sexo, idade e peso

Num estudo realizado por Robinson et al. (2020) demonstrou-se que existe maior predisposição dos machos para desenvolvimento de hemangiossarcoma. Carnio et al. (2020) e Robinson et al. (2020) referem também que animais castrados estão em maior risco de desenvolvimento de HSA, sugerindo um envolvimento hormonal nesta patologia, podendo isto ser explicado também pelo facto da castração ter como objetivo o aumento do tempo de vida do animal, logo, aumenta a probabilidade do animal desenvolver este tumor (Carnio et al., 2020).

Vários estudos relacionam a idade e peso do animal como fatores de risco, sendo observado uma média de idade e peso de cerca de 10 anos e 27 kg, respectivamente (Carnio et al., 2020; Kim et al., 2015).

1.5.4. Tipo sanguíneo

Em medicina Humana o sistema ABO, que incorpora os grupos sanguíneos A, B, AB e O, já é reconhecido como sendo um fator de risco para o desenvolvimento de diversos tipos de tumores (Franchini et al., 2015). O gene ABO codifica 2 tipos de alelos que irão ser convertidos em diferentes glicosaminotransferases, que por sua vez irão catalisar diferentes carboidratos, N-acetilgalactosamida ou D-galactose, que irão converter o antígeno H em antígeno A ou B, respectivamente (Franchini et al., 2015). Já o tipo O não irá codificar nenhuma glicosaminotransferase funcional, deixando o antígeno H sem alteração (Franchini et al., 2015). Estes antígenos serão expressos não só à superfície dos eritrócitos, mas também na superfície de diversas células e tecidos, incluindo epitélio, neurónios sensitivos, plaquetas e endotélio vascular (Franchini et al., 2015). A desregulação da atividade enzimática das glicosaminotransferases, implicadas no grupo sanguíneo, é umas das atuais hipóteses que podem explicar o maior risco dos grupos sanguíneos A e B de desenvolverem neoplasias, pois estas estão implicadas em processos como a adesão intercelular, sinalização de membranas celulares e resposta imune do hospedeiro, podendo a alteração destas moléculas de superfície promover processos neoplásicos (Franchini et al., 2015). Franchini et al., (2015) refere que as glicosaminotransferases regulam os níveis plasmáticos do fator Von Willebrand, interpretando este um papel importante como modulador da apoptose e angiogénese, processos representados na tumorigénese, podendo aqui ser reconhecida uma consequência de existir este tipo de desregulação a nível das glicosaminotransferases. Em medicina veterinária já foram descritos mais de 12 grupos sanguíneos, 7 internacionalmente reconhecidos e pertencendo ao sistema DEA (dog erythrocyte antigen): DEA 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (Blais, 2020). A nível transfusional e a nível clínico o sistema mais importante e mais utilizado é o DEA 1, em que os animais podem ou não expressar antígenos funcionais à superfície dos eritrócitos, sendo DEA 1 positivos ou DEA 1 negativos, respectivamente (Tocci, 2010; Polak et al., 2015; Blais, 2020). Em contraste com a medicina humana, em medicina veterinária ainda não existem estudos que exibam informação que relacione um tipo sanguíneo com uma maior prevalência de um tipo de tumor.

2. Diagnóstico

Grande parte dos animais que chegam à clínica com HSA visceral encontram-se num estado de letargia, fraqueza, perda de peso, distensão abdominal, dispneia, vômito, tosse e muitas vezes colapso, porém, os sinais apresentados dependem muito do local onde o tumor se encontra (Mullin & Clifford, 2019). Ao exame físico podem ser encontradas alterações como mucosas pálidas, pulso fraco, taquicardia, taquipneia, desidratação, distensão abdominal, arritmias, abafamento dos sons cardíacos, dispneia, organomegália notada por palpação,

petéquias e equimoses (Mullin & Clifford, 2019; Lang, 2020; Das et al., 2021). Para que seja realizado o estadiamento completo do hemangiossarcoma é necessário a realização de hemograma, painel bioquímico, urianálise, 3 vistas torácicas por raio-x, ecocardiografia, testes de coagulação e ainda ultrassonografia abdominal (Mullin & Clifford, 2019; Oakley & Chretien, 2020).

É realizado um estadiamento clínico (tabela 1) que irá ajudar o clínico a definir o tratamento mais correto para cada caso, para além de permitir definir o prognóstico do paciente (Mullin & Clifford, 2019; Oakley & Chretien, 2020).

Tabela 1- Sistema de estadiamento clínico do hemangiossarcoma canino (TMN), segundo Mullin & Clifford (2019)

Tumor primário (T)	
T0	Sem evidência de tumor
T1	Tumor < 5 cm de diâmetro e confinado aos tecidos primários
T2	Tumor ≥ 5 cm ou roturado, invadindo tecidos subcutâneos
T3	Tumor invade estruturas adjacentes, incluindo o músculo
Linfonodos regionais (N)	
N0	Sem envolvimento de linfonodos
N1	Envolvimento do linfonodo regional
N2	Envolvimento de linfonodo distante
Metástases distantes (M)	
M0	Sem evidência de metástases
M1	Metástases distantes
Estádios	
I	T0 ou T1, N0, M0
II	T1 ou T2, N0 ou N1, M0
III	T2 ou T3, N0, N1 ou N2, M1

2.1. Histopatologia e citologia

Atualmente o *gold standard* para o diagnóstico de hemangiossarcoma é a histopatologia, podendo em alguns casos ser diagnosticado também por citologia (Mullin & Clifford, 2019). A histopatologia permite um diagnóstico mais eficaz deste tipo de neoplasias. Mesmo dentro do mesmo tumor existe grande heterogeneidade morfológica da amostra, podendo conter áreas com uma apresentação bem diferenciada, sendo possível distinguir canais vasculares, formados por células endoteliais e áreas com apresentação mal diferenciada, em que podem ser observadas áreas sólidas compostas por células anaplásicas do estroma (Bertazzolo et al., 2005).

A citologia é um método diagnóstico fácil de utilizar e caso seja possível obter um diagnóstico do tumor é algo que rapidamente permite ao clínico tomar uma decisão terapêutica,

porém, uma citologia negativa não permite descartar a existência de neoplasia, para além de que tumores vasculares, como é o caso do hemangiossarcoma, provocam grande contaminação das amostras, tornando o diagnóstico ainda mais complicado (Tecilla et al., 2019). No caso de ser realizada uma aspiração por agulha fina guiada por ultrassonografia existe ainda o risco de ocorrência de hemorragia (38%) (Oakley & Chretien, 2020).

Pode ainda ser realizada imunohistoquímica a partir do tecido tumoral de modo a diferenciar o hemangiossarcoma de outros tipos de tumores, principalmente quando as características histopatológicas de HSA não são aparentes, através do uso, por exemplo, de marcadores como o fator Von Willebrand, CD31, CD34, CD117, claudina-5, VEGF e vimentina (Mullin & Clifford, 2019; Griffin et al., 2021).

2.2. Análises laboratoriais

Quanto às análises laboratoriais em pacientes com HSA são vários os parâmetros que podem encontrar-se alterados e é de notar que não devem ser utilizados como métodos de diagnóstico definitivo, mas sim como auxílio no diagnóstico. No hemograma as alterações mais comumente identificadas são anemia, trombocitopenia, esquisócitos, acantócitos, elevado tempo de protrombina (TP), elevado tempo de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT) e aumento dos produtos de degradação da fibrina, fibrinogénio e d-dímeros (Wong et al., 2015; Mullin & Clifford, 2019). A anemia é frequentemente de característica regenerativa (Mullin & Clifford, 2019; Das et al., 2021). Isto deve-se, não só a uma potencial anemia da doença crónica, como à existência de hemólise intravascular microangiopática, pois em animais com HSA existe um crescimento anormal das células endoteliais, levando a um maior crescimento de fibrina para o lúmen vascular podendo levar à rotura e hemólise dos eritrócitos, baixando assim o hematócrito dos pacientes (Wong et al., 2015). É reportado ainda o aparecimento de trombocitopenia em até 75% dos cães, que pode dever-se tanto a consumo, diminuição na produção, sequestro plaquetário e/ou destruição pelo tumor (Das et al., 2021; Griffin et al., 2021; Mullin & Clifford, 2019). Trombocitopenia derivada de sequestro plaquetário ocorre principalmente em processos malignos que provoquem organomegália, particularmente no baço (esplenomegália) (Childress, 2012). Cerca de um terço das plaquetas estão armazenadas no baço, logo, qualquer patologia em que ocorra esplenomegália irá aumentar a acumulação plaquetária neste órgão (Childress, 2012). Já a destruição plaquetária poderá ocorrer por um processo imunomediado, que geralmente ocorre em neoplasias malignas hematológicas (ex: linfoma, mieloma múltiplo, sarcoma histiocítico), ou não imunomediado, secundário a uma microangiopatia em pacientes com neoplasias (Helfand, 1988; M. Childress, 2012). Wong et al. (2015) indicam que um valor abaixo de 83000 plaquetas/ μ L tem um valor preditivo positivo para o diagnóstico de HSA (Wong et al., 2015). No caso da trombocitopenia tem que haver bastante cuidado na sua interpretação, pois a existência de agregados plaquetários pode resultar numa baixa contagem plaquetária na máquina, levando a resultados pouco fidedignos (Wong et al., 2015). Os acantócitos são eritrócitos, encontrados em esfregaços sanguíneos ou efusões, que apesar de apresentarem

volume celular normal, a sua forma apresenta mais de duas espículas que se projetam da membrana celular e estes são associados a diversas doenças, incluindo hemangiossarcoma (50%), decorrente de dano direto da parede ou alteração no metabolismo lipídico (Wong et al., 2015). Uma elevada contagem de acantócitos (>67 acantócitos/ 2000 eritrócitos ou >71 acantócitos/2000 eritrócitos do sangue periférico) apresenta um elevado valor preditivo positivo para o diagnóstico de hemangiossarcoma (Wong et al., 2015). Também os esquisócitos, são porções de eritrócitos fragmentados comumente encontrados em situações de CID, logo, podem também aparecer em cães com hemangiossarcoma. (Wong et al., 2015). Quanto aos tempos de coagulação, PT e aPTT, estes podem encontrar-se elevados em animais com este tipo de neoplasia, sendo mais comum quando o fígado é o órgão afetado, devido à sua produção de fatores de coagulação, podendo também haver prolongamento dos mesmos em outras neoplasias malignas ou benignas quando afetam este mesmo órgão, não sendo esta análise tão específica de HSA (Wong et al., 2015). Para além destas alterações, é de notar que cerca de 50% dos animais com HSA apresentam sinais de coagulação intravascular disseminada (CID), cujos critérios para esta determinação são a inclusão de trombocitopenia, aumentos dos produtos de degradação do fibrinogénio, tempos de coagulação prolongados, fragmentação eritrocitária e diminuição dos níveis de fibrinogénio (Davies & Taylor, 2020; Oakley & Chretien, 2020).

Para além destas alterações também a leucocitose é um achado comum em cães com hemangiossarcoma, nomeadamente leucocitose neutrofílica, devido à necrose tumoral juntamente com a inflamação associada (Wong et al., 2015)

Alterações bioquímicas são pouco específicas em pacientes com hemangiossarcoma, sendo reportado por vezes hipoproteinemia e potencial aumento das enzimas hepáticas (Davies & Taylor, 2020).

2.3. Diagnóstico por imagem

O diagnóstico por imagem é muito importante no processo de diagnóstico de HSA, bem como para o seu estadiamento. As radiografias torácicas devem ser realizadas para identificar metástases pulmonares, possíveis efusões pericárdicas ou alterações na silhueta cardíaca (Fabbi et al., 2017; Mullin & Clifford, 2019).

Com ecografia abdominal é possível aumentar o grau de suspeita de HSA, sendo possível identificar efusões abdominais, que são bastante comuns em cães com este tipo de tumor, bem como identificar o órgão em que se encontra o mesmo e cuja lesão pode variar quanto à ecogenicidade, apresentando normalmente aparência hipoecóica, cavitária e heterogénea (Mullin & Clifford, 2019; Oakley & Chretien, 2020). Para além dos exames complementares de diagnóstico por imagem anteriormente referidos, podem ainda ser realizadas ecocardiografias, para identificação de tumores cardíacos, e eletrocardiogramas, que nos possibilitam identificar arritmias ventriculares que ocorrem de forma comum em cães com HSA

(Mullin & Clifford, 2019). Em certas situações pode ainda utilizar-se diagnóstico de imagem avançado, como TAC e Ressonância Magnética, sendo esta última de grande utilidade para casos de hemangiossarcoma localizados no sistema nervoso do paciente (Mullin & Clifford, 2019; Mallol et al., 2022).

2.4. Biomarcadores

Biomarcadores têm sido explorados como testes não evasivos que permitem distinguir o hemangiossarcoma de outras doenças, permitindo um tratamento mais rápido e assertivo. Já foram estudados biomarcadores como a timidina quinase, cuja expressão ocorre apenas em células em proliferação e portanto estará mais elevada em cães com hemoabdómen por hemangiossarcoma ou outra neoplasia maligna do que em animais sem doença ou com neoplasia benigna (Thamm et al., 2012). Kirby et al., (2011) utilizaram eletroforese em duas dimensões com o objetivo de separar proteínas que servissem como biomarcadores para a identificação de cães com hemangiossarcoma, dado este tumor ser altamente vascularizado, tendo a capacidade de alterar a circulação de proteínas sanguíneas ou até colocar em circulação novas proteínas associadas a esta neoplasia. A proteína sérica, péptido de colagénio XXVII, mostrou ter o maior interesse, pois refletiu a presença do tumor, estando este bastante elevado no soro de animais que apresentam HSA, baixando os seus níveis após esplenectomia e aumentando novamente os valores em animais que têm recorrência do mesmo (Kirby et al., 2011). O colagénio fibrilar encontra-se abundantemente em tecido conjuntivo da pele, osso, tendões, ligamentos, paredes dos vasos sanguíneos e córnea (Kirby et al., 2011). A sua relação biológica com o HSA ainda não é conhecida, porém a sua maior concentração pode estar relacionada com a clivagem proteica e degradação nos tecidos circundantes (Kirby et al., 2011). Mais estudos têm que ser realizados para demonstrar a sua verdadeira especificidade e sensibilidade como biomarcador para o diagnóstico de cães com hemangiossarcoma (Kirby et al., 2011). A utilização da troponina I como biomarcador também demonstrou bons resultados quanto à identificação da etiologia de uma efusão pericárdica, permitindo diferenciar efusões pericárdicas idiopáticas, de efusões derivadas de hemangiossarcoma cardíaco (Shaw et al., 2004; Chun et al., 2010). A troponina cardíaca I é um marcador específico e sensível para identificar isquemia e necrose do miocárdio, algo que ocorre quando os cães apresentam efusão pericárdica, sendo estas alterações mais severas em cães que apresentam hemangiossarcoma a nível cardíaco (Shaw et al., 2004). Assim, Shaw et al., 2004 identificaram concentrações mais elevadas de troponina I cardíaca em cães com efusão pericárdica derivada de hemangiossarcoma cardíaco, comparativamente a cães com efusões pericárdicas de origem idiopática. Foram ainda estudados como biomarcadores o fator plasmático de crescimento do endotélio vascular (Clifford, Hughes, et al., 2000), a alfa-1-glicoproteína ácida (Yuki et al., 2011), bem como o uso de citometria de fluxo multiparamétrico com sangue periférico para detetar marcadores à superfície de células malignas de cães com HSA, permitindo auxiliar no diagnóstico deste tumor (Lamerato-Kozicki et al., 2006). O fator plasmático de crescimento do

endotélio vascular encontra-se mais elevado em animais com hemangiossarcoma, comparando com animais saudáveis (Clifford et al., 2000). Quanto à alfa-1-glicoproteína ácida foi demonstrado que se encontra em níveis mais elevados em tumores como carcinomas, sarcomas e tumores de células redondas e que esta é produzida pelo próprio tumor, tendo ainda a capacidade de diminuir a competência imune do animal (Yuki et al., 2011).

3. Terapêutica

A apresentação dos cães que chegam com HSA tende a ocorrer em situações de urgência, em que este se encontra clinicamente descompensado, por vezes com sinais evidentes de choque, apresentando mucosas pálidas, aumento do tempo de repleção capilar, pulsos fracos, taquicardia, prostração e fraqueza, tendo primariamente que ocorrer estabilização do paciente (Herold et al., 2008). É realizada fluidoterapia, cujo objetivo será restabelecer o volume circulatório, oxigenoterapia e analgesia caso os pacientes apresentem sinais evidentes de dor e desconforto e transfusão sanguínea caso haja perda significativa de sangue ou sinais evidentes de défices da coagulação (Herold et al., 2008). Deverá ser realizada uma ecografia FAST abdominal para que seja identificada alguma possível fonte de hemorragia que tenha que ser parada assim que o paciente esteja suficientemente estável (Herold et al., 2008). As principais causas não traumáticas de hemorragia abdominal (hemoabdómen) são alterações da coagulação, isquemia, hematoma e rotura de tumor, esta última ocorrendo com bastante frequência em cães com HSA esplênico (Herold et al., 2008).

3.1 Abordagem cirúrgica

A melhor abordagem para tratamento de HSA é a excisão cirúrgica do tumor (Mullin & Clifford, 2020). Os tumores cutâneos e subcutâneos são excisados com margens de 1-2 cm e um plano fascial em profundidade, podendo existir cura caso não haja metastização regional ou à distância (Batschinski et al., 2018). Em tumores esplênicos é realizada esplenectomia completa e em tumores hepáticos e renais são realizados lobectomia e nefrectomia, respetivamente (Batschinski et al., 2018; Mullin & Clifford, 2020). Já em tumores cardíacos é difícil a receção completa do tumor, podendo, no entanto, ser realizado pericardiectomia paliativa via toracotomia ou toracosopia e auriclectomia (Case et al., 2013; Arai et al., 2019). Existe ainda a possibilidade de realizar amputações em alguns cães, cujas margens de excisão não consigam ser atingidas, como por exemplo alguns tumores a nível intramuscular (Mullin & Clifford, 2019). Com exceção do hemangiossarcoma cutâneo é raro existir uma cura completa (Batschinski et al., 2018).

3.1.1. Esplenectomia completa por laparotomia

Em casos de suspeita de tumor esplênico a cirurgia mais aconselhada será a esplenectomia completa por laparotomia, visto que em situações de maior urgência nos permite ter uma melhor visualização do que está a ocorrer, quando comparado com a realização de cirurgia por laparoscopia (Richter, 2018).

Após a anestesia, o animal é colocado em decúbito dorsal e é realizada uma celiotomia na linha média desde o processo xifóide à púbis, permitindo que haja boa visualização, principalmente quando o animal apresenta evidente hemorragia e requer cuidados mais atempados (Richter, 2018). Seguidamente à identificação do baço e controlo da hemorragia é necessário prosseguir cirurgicamente à ligação dos vasos sanguíneos (artéria gastroepiloica esquerda, pequenas veias e artérias gástricas e artérias e veias esplénicas), podendo isto ser realizado através de ligaduras individuais ou através de um aparelho de selação de vasos, este último permitindo maior rapidez de todo o processo (Richter, 2018). Ao contrário do que se pensava anteriormente, a ligação destas artérias esplénicas e pequenas artérias gástricas não compromete o fluxo sanguíneo para a curvatura maior do estômago, tendo ainda a vantagem de permitir uma cirurgia mais rápida (Rivier & Monnet, 2011). O aparelho de selação de vasos mencionado permite mínima manipulação do órgão e permite realizar pressão sobre os tecidos emitindo posteriormente uma energia bipolar ou ultrassónica, permitindo que o colagénio e elastina dos vasos cerre os próprios vasos (Rivier & Monnet, 2011; Richter, 2018). Pode ainda ser utilizado intra-cirurgicamente um eletrocautério bipolar que permite uma hemóstase eficaz e rápida (Rivier & Monnet, 2011; Richter, 2018). Caso sejam realizadas ligaduras é aconselhado recorrer a ligadura dupla dos vasos esplénicos, para minimizar a possibilidade de hemorragia pós-operatória (Richter, 2018). Antes de fechar é aconselhado ainda a realização de uma lavagem abdominal seguida de inspeção de qualquer hemorragia que possa ainda existir (Richter, 2018).

3.1.2 Esplenectomia laparoscópica

A laparoscopia abdominal é uma técnica cirúrgica minimamente invasiva que tem como vantagem um pós operatório menos doloroso, uma recuperação mais rápida, para além de haver contaminação mínima, reduzindo bastante o risco de infeções (Wright et al., 2016).

Wright et al. (2016) descreve a esplenectomia laparoscópica como sendo uma técnica algo complexa, com possibilidade de hemorragia excessiva e tempos cirúrgicos aumentados, comparando com esplenectomia por laparotomia, havendo ainda a grande possibilidade de ter que se realizar laparotomia aberta, caso haja alguma complicação. Segundo este estudo esta técnica pode ser realizada em massas de pequenas dimensões, beneficiando das vantagens mencionadas acima, sendo contraindicada quando temos massas médias/grandes (largura X comprimento, >4 X4cm), pois terá que haver uma maior manipulação, aumentando muito o risco de hemorragia (Wright et al., 2016).

3.1.3 Complicações da esplenectomia

É necessário reconhecer as complicações que podem decorrer da realização de uma esplenectomia para podermos atempadamente assistir o paciente caso seja necessário (Richter, 2018). Com maior frequência podem ocorrer hemorragias, obstrução vascular e arritmias cardíacas (Richter, 2018). A hemorragia pós-operatória é sem dúvida das ocorrências mais

frequentes, podendo dar-se por má ligação dos vasos sanguíneos durante a cirurgia, sendo assim aconselhada a monitorização do hematócrito do paciente (Richter, 2018). Os trombos podem ocorrer no período pós-cirúrgico, principalmente no sistema porta, nomeadamente na veia porta (Richter, 2018). Já as arritmias cardíacas, usualmente do tipo ventricular prematuras ou taquicardia ventricular, sabe-se que ocorrem com alguma frequência em animais com hemangiossarcoma, hematomas e em animais que realizaram esplenectomia (Richter, 2018). A causa destas arritmias é dada não só pela isquemia do miocárdio, provocada pelo baixo retorno venoso e possível choque hipovolémico, provocado pela massa roturada, bem como por possíveis desequilíbrios ácido-base e de eletrólitos, microembolismo e hipovolemia (Richter, 2018). É recomendada a monitorização do ritmo cardíaco através de eletrocardiogramas (Richter, 2018). Para além destas complicações também estão documentadas outras ocorrências, nomeadamente, dilatação e torção gástrica após esplenectomia, devido ao estiramento que existe dos ligamentos gastrosplénico, hepatoduodenal e hepatogástrico (Richter, 2018). O baço tem como função armazenar reservas de eritrócitos, bem como retirar da circulação eritrócitos infetados seja por bactérias, rickettsias ou hemoparasitas (Richter, 2018). Assim sendo, após a esplenectomia existe também um maior risco de hipóxia e isquémia, pois não haverá o suplemente de eritrócitos oxigenados, provenientes do baço, para a circulação, havendo assim maior risco de infeção (Richter, 2018).

3.2 Quimioterapia

3.2.1 Quimioterapia metronómica Vs Quimioterapia convencional

Devido à elevada capacidade de metastização por parte deste tumor é indicada a realização de quimioterapia após a excisão do mesmo (Batschinski et al., 2018; Mullin & Clifford, 2019). Existem duas abordagens a que podemos recorrer para realizar quimioterapia: (1) Quimioterapia convencional (ou citotóxica), que usa a máxima dose tolerada, com o objetivo de destruir o maior número de células neoplásicas possível, incluindo pausas na administração dos fármacos para que haja recuperação dos tecidos normais; (2) Quimioterapia metronómica, que implica o uso continuado de drogas quimioterápicas, em doses mais baixas, com ou sem uso de anti-inflamatórios não esteróides (AINES) (Biller, 2014; Matsuyama et al., 2017; Batschinski et al., 2018; Mullin & Clifford, 2020). Ao contrário da quimioterapia convencional, a quimioterapia metronómica tem como alvo de ação a vasculogénese e angiogénese tumoral, com a sua ação anti-angiogénica e anti-proliferativa sobre as células precursoras endoteliais, bem como ação sobre células imunológicas, que facilitam o ataque do tumor sobre o sistema imune (Biller, 2014; Chaikin & Welihozkiy, 2018). O tumor expressa antigénios próprios que apenas são tolerados pelas células T graças às células T reguladoras, que irão ser alvo da quimioterapia metronómica, reduzindo o número destas células T reguladoras em circulação (Finotello et al., 2017; Matsuyama et al., 2017; Chaikin & Welihozkiy, 2018).

São inúmeros os estudos que indicam diversos tipos de protocolos de quimioterapia para animais com HSA. Como exemplos de quimioterapia convencional temos o uso de doxorrubicina

(DOX) como agente único ou em combinações com outros fármacos como a ciclofosfamida (CF), minociclina, vincristina, metotrexato, dacarbazina, ifosfamida e deracoxib (Mullin & Clifford, 2020). Mais recentemente o uso de quimioterapia metronômica tem vindo a ganhar interesse, tendo sido publicados diversos estudos usando esta abordagem metronômica com fármacos como clorambucil, talidomida, lomustina e ciclofosfamida, sendo esta última a mais utilizada em animais com HSA (Biller, 2014; Mullin & Clifford, 2020). Para propósitos desta dissertação e devido à grande quantidade de protocolos existentes apenas serão abordados os fármacos utilizados neste estudo.

3.2.2 Fármacos

3.2.2.1 Doxorubicina

Vários estudos indicam que protocolos com base em doxorubicina aumentam a sobrevivência de animais com HSA esplênico em 5-6 meses (Batschinski et al., 2018). Batschinski et al., (2018) usaram o protocolo com um total de 6 ciclos de doxorubicina, dada por via intravenosa a cada 21 dias, usando doses de 30 mg/m² (animais com > 15kg) ou 1 mg/kg (animais com ≤ 15 kg). Animais tratados com cirurgia seguida de quimioterapia com doxorubicina têm tempos de sobrevivência bastante maiores que animais apenas tratados com cirurgia, porém, os animais que vivem mais de 1 ano continuam a ser poucos (16%) (Batschinski et al., 2018). Apesar da doxorubicina ser a droga mais utilizada para tratamento de HSA tem a desvantagem de causar cardiotoxicidade cumulativa dependente da dose, podendo não ser aconselhada em todos os pacientes e ter de ser descontinuada a certa altura do tratamento (Faulhaber et al., 2021). Para além deste efeito secundário, já são bem conhecidos outras alterações provocados pela sua toxicidade, assim como: 1) anemia, leucopénia e trombocitopénia, devido ao efeito supressor sobre a medula óssea, 2) aumento da ureia e creatinina, bem como proteinúria e hematuria decorrentes de nefropatia e 3) efeitos gastrointestinais, por dano da mucosa e vilosidades intestinais (Manno et al., 2016). Teske et al. (2011) descreve uma alternativa à administração de doxorubicina de forma livre, nomeadamente, doxorubicina lipossomal peguilhada (PL-Dox). A PL-Dox apresenta uma semi-vida plasmática superior à doxorubicina livre, menor "clearance" plasmático e menor volume de distribuição em cães, para além de apresentar menores efeitos secundários de cardiotoxicidade do que a Dox livre (Teske et al., 2011). Porém, comparativamente à Dox livre, a PL-Dox não aumentou o tempo de sobrevivência de cães com hemangiossarcoma visceral (Teske et al., 2011).

3.2.2.2 Carboplatina

A carboplatina é um fármaco utilizado como adjuvante para o tratamento de vários tipos de tumores, nomeadamente osteossarcoma em cães (Faulhaber et al., 2021). A dose utilizada de carboplatina é de 300 mg/m², via intravenosa, a cada 3 semanas, administrada cerca de 4 vezes (Gustafson & Bailey, 2020; Faulhaber et al., 2021). Segundo Faulhaber et al., (2021) a média de tempo de sobrevivência de cães com HSA esplênico tratados com Carboplatina, versos

tratados com doxorubicina foi muito similar, podendo ser o uso de carboplatina uma boa alternativa para tratamento de HSA, visto ter menos efeitos secundários. O principal efeito secundário e que limita a dose da carboplatina é a mielotoxicidade, podendo ocorrer neutropenia e trombocitopenia nestes animais (Coffee et al., 2020).

3.2.2.3 Ciclofosfamida

A ciclofosfamida é um agente quimioterápico que pode ser dado via oral ou intravenoso nos nossos animais de companhia (Gustafson & Bailey, 2020). Pode ser utilizado em dose convencional, administrando bolus entre 200 a 250 mg/m² ou fracionado, administrando uma dose de 50-75 mg/m², via oral, durante 3-4 dias consecutivos (Gustafson & Bailey, 2020). Cada vez mais a ciclofosfamida tem sido utilizada em protocolos de quimioterapia metronómica, associada ou não a outros agentes anti tumorais e anti-inflamatórios não esteróides (Gustafson & Bailey, 2020). No estudo de Matsuyama et al., (2017) várias doses metronómicas de ciclofosfamida foram utilizadas, desde 10 -15 mg/m² diariamente até 25 mg/m² a cada dois dias.

De entre os efeitos secundários da ciclofosfamida os mais espectáveis serão neutropenia e cistite hemorrágica estéril, esta última ocorrendo devido a um metabolito da ciclofosfamida, a acroleína, capaz de irritar a mucosa da bexiga (Matsuyama et al., 2017; Gustafson & Bailey, 2020). Também podem ocorrer, com menor frequência, alguns sinais clínicos gastrointestinais, como náuseas e vômitos (Gustafson & Bailey, 2020).

Marconato et al. (2019) chegaram à conclusão que o uso de um protocolo convencional baseado em doxorubicina leva a um aumento do tempo de sobrevivência, comparativamente a animais que realizaram protocolos de quimioterapia metronómica baseada em ciclofosfamida, e talidomida em combinações com piroxicam e meloxicam. No estudo realizado por Matsuyama et al. (2017) utilizando cães com HSA esplénico, os resultados referem que cães que completaram as sessões de quimioterapia apenas com doxorubicina e cães que completaram doxorubicina e seguidamente realizaram quimioterapia metronómica com ciclofosfamida não tiveram resultados muito diferentes quanto ao tempo de sobrevivência, no entanto, não foi administrado qualquer anti-inflamatório não esteróide.

3.2.2.4 Clorambucil

O clorambucil é um fármaco de rápida absorção, que se encontra disponível para administração via oral (Gustafson & Bailey, 2020). A dose convencional utilizada para administração diária é de 2-8 mg/m² e sabe-se que a dose de 4 mg/m² é bem tolerada para uso crónico e tem vindo a ser utilizada em protocolos de quimioterapia metronómica (Mutsaers & Biller, 2020). Doses mais elevadas (6-8 mg/m²) podem levar a efeitos secundários como alterações gastrointestinais e mielossupressão (Mutsaers & Biller, 2020).

Assim como a quimioterapia metronómica usando ciclofosfamida, o uso de clorambucil com a mesma abordagem, em conjunto com um polisacaridopeptido (PSP), resultou num tempo

de vida bastante elevado para um cão, com a vantagem do animal manter uma boa qualidade de vida (Chaikin & Welihozkiy, 2018). No estudo anterior, a reduzida amostra utilizada leva-nos a interpretar este resultado com alguma cautela.

3.3 Outras alternativas terapêuticas

Para além da quimioterapia, têm sido estudadas alternativas para o tratamento deste tumor, cujo tempo de vida continua a ser bastante baixo. Existem alternativas como terapia alvo com o uso de inibidores da tirosina quinase, imunoterapia usando vacinas autólogas e terapias alternativas com ervas medicinais chinesas (Batschinski et al., 2018; Mullin & Clifford, 2020). Radioterapia não é muito usada para tratamento de hemangiossarcoma devido à sua rapidez de metastização e localização (Mullin & Clifford, 2020).

3.3.1 Radioterapia

A radioterapia não tem sido muito utilizada para tratar animais com hemangiossarcoma (Griffin et al., 2021). Foram realizados protocolos de radioterapia como tratamento paliativo, em HSA não esplénicos, com o objetivo de diminuir o tamanho deste, porém os resultados obtidos não foram muito favoráveis e não houve um prolongamento na sobrevivência destes animais (Griffin et al., 2021). Poderá ser um tratamento a considerar em casos de HSA não visceral, cuja excisão cirúrgica não possa ser completa ou em casos de HSA cardíaco, havendo a possibilidade de diminuir o tamanho da neoplasia e assim diminuindo a necessidade de pericardiocentese em pacientes com hemopericárdio e conseqüente tamponamento cardíaco (Griffin et al., 2021).

Serão necessários mais estudos para conseguir avaliar os benefícios que este tipo de tratamento pode trazer para neoplasias tão agressivas como o HSA (Griffin et al., 2021).

3.3.2 Imunoterapia

A imunoterapia ainda não é uma opção terapêutica muito utilizada para tratamento do hemangiossarcoma, mas assim como a radioterapia mais estudos devem ser realizados para avaliar a sua verdadeira eficácia (Griffin et al., 2021).

Foi realizado um estudo que demonstra a possível eficácia de uma vacina anti-tumoral que pode ser utilizada em animais com hemangiossarcoma (U'Ren et al., 2007). Neste estudo foi possível perceber que os animais, que receberam a vacina e concomitantemente realizaram quimioterapia com doxorrubicina, toleraram bem esta nova terapia e desenvolveram resposta imune humoral contra um antígeno controlo, bem como contra células de hemangiossarcoma canino (U'Ren et al., 2007). Quanto ao tempo de sobrevivência em pacientes que optam por este tipo de tratamento, ainda está por estudar se realmente existe um aumento do tempo médio de vida utilizando este tipo de abordagem (U'Ren et al., 2007). Vail et al. (1995) também contribuíram para o conhecimento da imunoterapia com o seu estudo, utilizando imunomoduladores encapsulados em lipossomas (L-MTP-PE). Concluíram nesse mesmo estudo que este L-MTP-PE possui atividade antimetastática em animais que possuem HSA

minimamente responsivo à quimioterapia (Vail et al., 1995). Ainda, no estudo de Brown & Reetz. (2012) foi utilizado o polissacaridopeptido (PSP), agente bioativo de um cogumelo (*Coriolus versicolor*), cuja capacidade anti-tumoral em culturas de tecidos já é conhecida. Foi verificado que, de facto, a administração de uma dose de 100 mg/kg/dia de PSP permitiu obter resultados de sobrevivência média de 199 dias, sendo isto superior a grande parte dos casos reportados de animais que recebem protocolos baseados em doxorubicina, para além de prolongar o tempo até ao aparecimento de metástases (Brown & Reetz, 2012).

4. Prognóstico

Devido à sua progressão silenciosa, principalmente a nível visceral, o prognóstico para animais diagnosticados com hemangiossarcoma, na maior parte das vezes, é mau (Matsuyama et al., 2017). O local de aparecimento do tumor irá, na maior parte das vezes, definir um melhor ou pior prognóstico, em que, por exemplo, tumores cutâneos tendem a ter um melhor prognóstico que neoplasias a nível visceral (Batschinski et al., 2018).

O baço é o órgão mais afetado por este tipo de tumor, e sendo este um órgão interno frequentemente a sua presença apenas é identificada quando estamos perante um estado bastante avançado (Rozolen et al., 2021). Temos de ter em conta que o estadiamento a que o tumor é diagnosticado tem muita importância no que toca ao prognóstico do paciente, sendo que HSA em estadiamento III têm o pior prognóstico (Rozolen et al., 2021). Animais que apresentam estádios I e II apresentam também grande desafio, porém, o tempo de sobrevivência tende a ser maior (Masyr et al., 2021; Rozolen et al., 2021). Assim, a presença de metástases antes da cirurgia (estadiamento III) implica que o animal tenha um prognóstico relativamente pior a um animal que não tenha estas mesmas alterações, seguindo a tabela de estadiamento clínico (tabela 1), justificando assim a importância de métodos de diagnóstico, como a radiografia antes do procedimento cirúrgico (Griffin et al., 2021).

Um estudo recente associou certos marcadores como Claudina-5, PSMA e gene Ki67/expressão da sua proteína como marcadores prognósticos em cães com hemangiossarcoma (Rozolen et al., 2021). A claudina-5 é uma proteína de membrana, responsável pela integridade e manutenção das membranas vasculares, o PSMA é um marcador de tumor prostático, cuja sua presença já foi identificada em hemorragias abdominais e a Ki-67 é uma proteína encontrada a nível do núcleo, usada para avaliação da proliferação celular (Rozolen et al., 2021). Neste estudo chegaram à conclusão de que tanto a claudina -5, como a expressão do gene PSMA podem ser utilizadas como fatores prognósticos para o aparecimento e desenvolvimento de metástases (Rozolen et al., 2021). Quanto à expressão do gene PSMA também foi possível identificar uma correlação direta entre a sua presença e o prognóstico do animal (Rozolen et al., 2021). O index Ki67 também foi avaliado e demonstrou estar mais elevado em animais num estadiamento mais avançado, comparativamente a animais com HSA de estadiamento mais

baixo (Rozolen et al., 2021). Assim, todos estes marcadores podem ser utilizados como possíveis fatores prognósticos em cães com hemangiossarcoma (Rozolen et al., 2021) .

No estudo de Masyr et al. (2021), fatores como a contagem de leucócitos, a presença de hemoabdômen ou a ocorrência de transfusão sanguínea não foram identificados como sendo fatores de mau prognóstico. No entanto, a presença de trombocitopénia demonstrou estar relacionada com um pior prognóstico, podendo isto estar diretamente associado a perturbações hemostáticas (Masyr et al., 2021). Para além do seu conhecido papel relacionado com a hemóstase, as plaquetas têm também, a certo nível, função reguladora do sistema imune, podendo isto levar a uma diminuição da resposta imunitária por parte do animal, piorando assim o seu prognóstico (Masyr et al., 2021).

Na tabela 2 pode-se observar o tempo médio de sobrevivência encontrados na literatura de cães com HSA que realizaram algum tipo de tratamento, desde animais que apenas realizaram esplenectomia, até animais que realizaram esplenectomia e posteriormente quimioterapia adjuvante. Os pacientes que apenas realizaram esplenectomia obtiveram as piores médias em dias de sobrevivência, com cerca de 42-86 dias (Batschinski et al., 2018; Marconato et al., 2019; Faulhaber et al., 2021). Em contraste, a combinação de esplenectomia com posterior quimioterapia metronómica com clorambucil e polisacaridopeptido (PSP) obteve o maior tempo de sobrevivência, de cerca de 2 anos (Chaikin & Welihozkiy, 2018), seguido pelos valores médios de sobrevivência de animais que realizaram esplenectomia seguida de quimioterapia convencional com doxorubicina (90 -274 dias) (Matsuyama et al., 2017; Batschinski et al., 2018; Faulhaber et al., 2021). Porém, este tratamento convencional com altas doses de doxorubicina também foi o que obteve maiores reações adversas por parte dos animais (Matsuyama et al., 2017; Batschinski et al., 2018; Faulhaber et al., 2021). Por fim, aqueles que receberam quimioterapia metronómica após esplenectomia, obtiveram tempos de sobrevivência médios de 58 -178 dias, com a vantagem de obterem uma melhor qualidade de vida (Lana et al., 2007; Finotello et al., 2017; Matsuyama et al., 2017; Marconato et al., 2019;). Exceto no estudo de Marconato et al., (2019), estudos em que os animais realizaram quimioterapia metronómica em conjunto com um anti-inflamatório não esteroide inibidor da cicloxigenase 2 (AINES-Cox2) (Lana et al., 2007; Finotello et al., 2017) obtiveram melhores resultados (168- 178 dias) que aqueles que utilizaram quimioterapia metronómica sem o uso de AINES-Cox2 (134 dias) (Matsuyama et al., 2017).

Tabela 2- Tempos médios de sobrevivência, em dias, dos diversos tratamentos encontrados na bibliografia. O * refere estudos que apenas utilizaram um animal. Cx- cirurgia; Dox- Doxorubicina; Carbo- Carboplatina; Ciclo- Ciclofosfamida; Cox2- Anti-inflamatório não esteróide inibidor da cicloxigenase 2; Clora- Clorambucil; PSP- Polissacaridopeptido.

Tratamento	Tempo médio de Sobrevivência (dias)	Referências
Cirurgia (Cx)	42-86	Faulhaber et al., 2021
	66	Batschinski et al., 2018
	40	Marconato et al., 2019
Cx + Dox	90-274	Batschinski et al., 2018
	139	Faulhaber et al., 2021
	98	Matsuyama et al., 2017
Cx + Carbo	160	Faulhaber et al., 2021
Cx + etoposido + ciclo + Cox2	178	Lana et al., 2007
Cx + talidomida + ciclo + Cox2	58	Marconato et al., 2019
Cx + Clora + PSP	730*	Chaikin & Welihozkiy, 2018
Cx + Dox + Ciclo	134	Matsuyama et al., 2017
Cx + Dox + ciclo + Cox2	168	Finotello et al., 2017

II. Objetivos da dissertação

O objetivo principal deste estudo prende-se na compreensão dos fatores que afetam o tempo de sobrevivência de animais com hemangiossarcoma esplênico. Os fatores avaliados já são, em parte, estudados na literatura científica encontrada, porém, é desejado também com esta dissertação a introdução de outros fatores potencialmente influenciadores no tempo de sobrevivência, como o tipo sanguíneo dos animais, permitindo assim impulsionar diferentes estudos que permitam compreender mais este tumor, que tanto afeta a população de cães existente e cujo prognóstico continua sem mudanças significativas. Assim, neste estudo, os fatores potencialmente influenciadores da sobrevivência de cães com hemangiossarcoma esplênico subdividem-se em três categorias:

- Fatores intrínsecos ao próprio animal - Refere-se ao sexo, à raça, à idade, ao peso e ao tipo sanguíneo do paciente. Estes fatores não são influenciados pela neoplasia, nem pela terapêutica administrada.
- Apresentação clínica - Refere-se aos resultados do hemograma e presença de hemoabdômen, ou seja, fazem parte dos sinais clínicos que o animal apresenta no momento do diagnóstico.

- Terapêutica – Refere-se mais concretamente ao protocolo quimioterapêutico e à realização de transfusões sanguíneas. Estes fatores podem ser influenciados por fatores externos, não avaliados neste estudo, e que por si só já estão descritos na literatura como influenciadores da sobrevivência de cães com hemangiossarcoma esplênico, assim como o score mitótico e estadió clínico.

III. Materiais e Métodos

1. Recolha de dados

Os dados para este estudo foram recolhidos a partir das bases de dados usadas pelo Centro Hospitalar Veterinário do Porto, Ivetclinic (2012-2021) e petuniversal (2021).

Primeiramente foi feita uma seleção dos casos totais de hemangiossarcoma do programa ivetclinic, desde o início do uso do programa (2012), utilizando as palavras-chave: hemangiossarcoma, hemangiossarcoma, esplênico e esplenectomia. A partir dos casos encontrados foi realizado uma base de dados em Excel com a informação de cada caso e posteriormente confirmado se realmente constava de um cão, que tivesse realizado esplenectomia e cujo diagnóstico final, dado através da realização de histopatologia, tivesse sido hemangiossarcoma. Os animais que não tivessem estes parâmetros foram eliminados da base de dados. Foi realizado o mesmo procedimento a partir do programa petuniversal, que continha os casos mais recentes. Quando confirmados todos os casos foram ainda adicionadas informações ao Excel, nomeadamente: idade, raça, sexo, peso, valores do hemograma ao diagnóstico, antes de realizado qualquer tipo de tratamento (Leucócitos, eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas), tratamento utilizado (cirurgia ou cirurgia + quimioterapia), presença ou ausência de hemoabdomen, fármaco da quimioterapia, data de morte/última consulta, data de diagnóstico, estado (vivo ou morto), tipo sanguíneo (DEA 1 positivo ou negativo) e número de dias entre diagnóstico e última consulta e a morte do animal, ou em alguns casos, última consulta registada no sistema, quando deixa de haver qualquer registo do paciente por mais de 5 anos.

Para todas as variáveis, sempre que não se encontrava a informação no sistema, para esse animal essa variável foi classificada como “sem registo”. Exceção feita para as variáveis raça e quimioterapia. No caso da raça, na ausência de registo, o animal foi classificado como “Sem raça definida” (SRD), no entanto, cães de raça cruzada também foram classificados como SRD. Já no caso da quimioterapia, na ausência de registo da utilização de fármacos para quimioterapia, para esta variável, o animal foi classificado como “Sx tratamento”, tendo sido apenas confirmada a realização de esplenectomia.

Outras informações foram recolhidas, com o objetivo de serem incluídas na análise estatística, nomeadamente, índice mitótico, estadiamento clínico, presença ou não de metástases à distância, porém, estas não podem constar no estudo devido à falta de grande

parte dessas mesmas informações na base de dados, escrita pelos clínicos, durante ou após as consultas, o que não permitia o cálculo do modelo estatístico para essas variáveis.

Foram recolhidas, no total, informações de 38 cães que apresentavam hemangiossarcoma esplênico como diagnóstico.

2. Variáveis em estudo

Com o objetivo de identificar quais os fatores que influenciam a sobrevivência de cães com hemangiossarcoma esplênico foram utilizadas as seguintes variáveis: Sexo, Raça, Idade, Peso, Tipo de Sangue, Transfusão, Hemoabdómen, Glóbulos Brancos (WBC), Linfócitos (Lym), Hematócrito (HTC), Glóbulos Vermelhos (RBC), Hemoglobina (HGB), Plaquetas (PLT) e Tratamento. As variáveis supramencionadas foram submetidas a uma análise estatística para avaliar a sua influência na sobrevivência em dias, que corresponde ao número de dias entre o diagnóstico e a última consulta registada (em animais que não têm qualquer registo no sistema passados cinco anos da última consulta) ou data de morte.

As variáveis Idade e Peso são variáveis contínuas, enquanto as variáveis Sexo, Raça, Tipo de Sangue, Hemoabdómen, Transfusão sanguínea e Tratamento são variáveis categóricas. Por fim, as variáveis WBC, Lym, HTC, RBC, HGB e PLT, apesar de serem variáveis numéricas, foram convertidas em variáveis categóricas, de forma a diferenciar entre cães com valores dentro dos intervalos de referência, de cães com os valores fora dos intervalos de referência, ignorando deste modo alterações nestes parâmetros dentro dos limites normais.

3. Análise estatística

Numa primeira análise foi realizado o teste de correlação de Pearson, para identificar variáveis altamente correlacionadas (correlação superior a 95%). No caso desta dissertação, as variáveis altamente correlacionadas foram o hematócrito, os valores de hemoglobina e a contagem de eritrócitos.

De seguida foi realizada uma análise de sobrevivência utilizando o modelo Cox Hazards Ratio, que permite a utilização de variáveis categóricas não binárias. Cada variável foi avaliada individualmente. De cada modelo foi recolhido o nível de significância ($p < 0,05$) e o “Hazard Ratio”, que corresponde a uma maior ou menor probabilidade de morte quando comparado com um valor padrão. Devido às características do modelo, os níveis de significância e os “Hazard Ratios” são calculados por comparação a um dos valores de cada uma das variáveis. Ao contrário da maioria dos estudos realizados em oncologia, não foi realizada uma análise com o modelo Kaplan-Meier devido à presença de duas variáveis contínuas (idade e peso), cujas variáveis não conseguem ser suportadas pelo modelo Kaplan-Meier. Por esta razão foi utilizado o modelo Cox Hazard Ratio, que foi aplicada a todas as variáveis, de modo a uniformizar a análise, mantendo sempre o mesmo erro do modelo.

Por fim, foi construído um modelo multivariado Cox Hazards Ratio com as variáveis que individualmente foram significativas. Este modelo multivariado tem como objetivo identificar se a interação entre variáveis afeta a sobrevivência em cães com hemangiossarcoma. Ao contrário do modelo Kaplan-Meier, o modelo utilizado neste estudo permite a realização de uma análise multivariada com a utilização conjunta de variáveis contínuas e categóricas, permitindo inferir a influência de diferentes variáveis na sobrevivência de cães com hemangiossarcoma esplênico.

IV. Resultados

1. Estatística descritiva

1.1. Caracterização da amostra em estudo

Neste estudo, foram incluídos 38 cães com hemangiossarcoma (n=38), 21 são fêmeas (55,3%) e 17 são machos (44,7%).

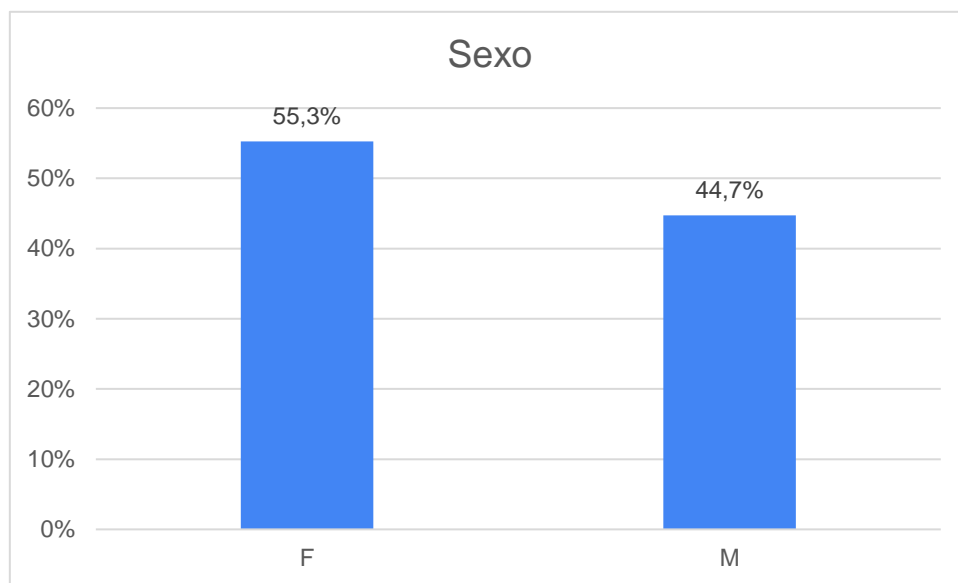


Figura 2- Distribuição dos sexos de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. F- Denomina as fêmeas e M- denomina os machos.

Quanto à raça, em conjunto a raça Labrador e cães sem raça definida (SRD) perfazem mais de 50% da amostra (Labrador = 34%(n=13); SRD = 29%(n=11)). As raças Leão da Rodésia, Cocker Spaniel Inglês e Bulldog francês apenas correspondem a cerca de 8% da amostra em estudo (n=3), visto apenas existir um representante de cada uma destas raças.

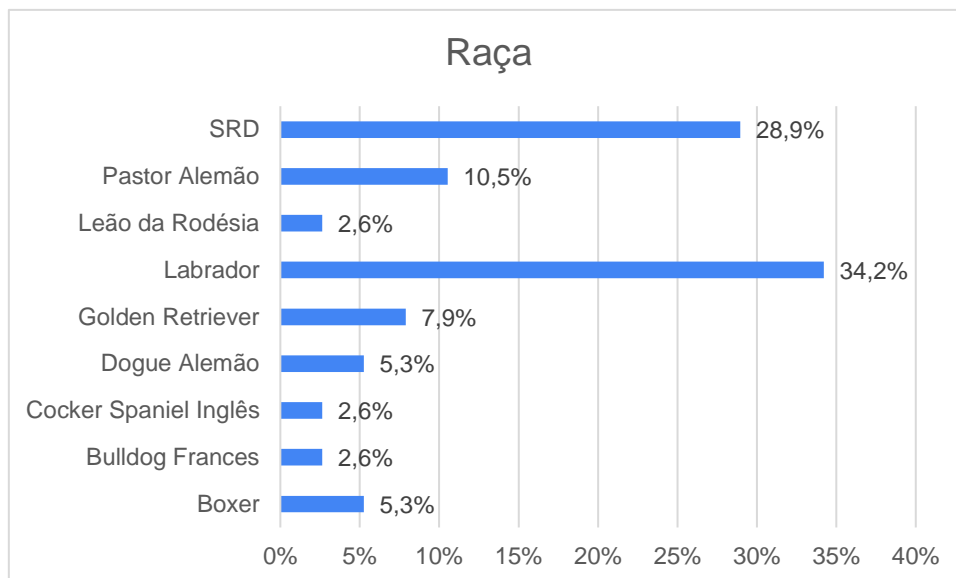


Figura 3- Distribuição das raças de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. SRD- Sem raça definida.

Os cães com 8 anos de idade compõem 21,1% (8 cães) da amostra, seguido dos cães com 12 anos de idade (15,8%) e dos cães com 7 anos de idade (13,2%). As idades menos representativas da amostra em estudo foram animais com 6 anos de idade e animais com 14 anos de idade, com apenas 1 cão apresentando cada uma destas idades. A média de idades foi de aproximadamente 9,6 anos. A média de idades é de 11 anos, com uma mediana de 9 anos e um desvio padrão de +/- 2,42 anos.

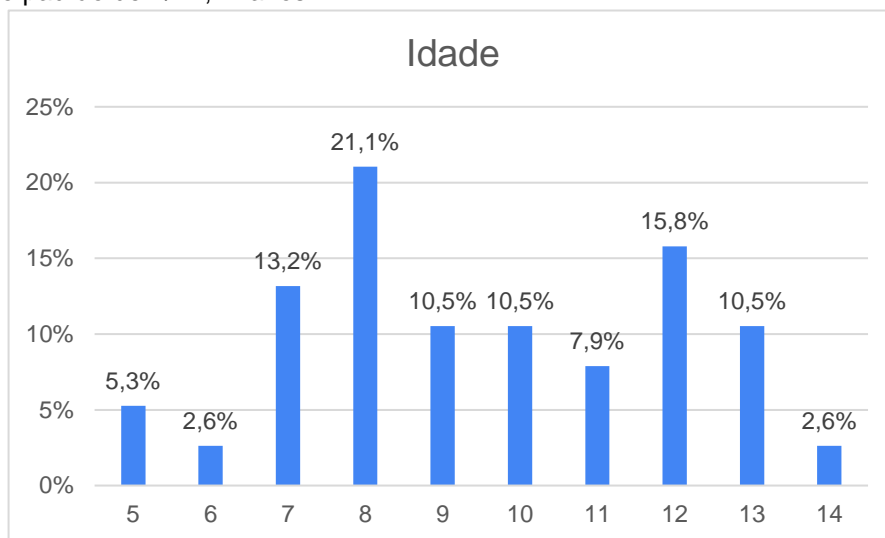


Figura 4- Distribuição da idade, em anos, de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia.

No que diz respeito à distribuição dos pesos, observa-se que os animais com pesos entre os 33-44 kg representam 37,84% dos animais com hemangiossarcoma esplênico neste estudo, seguidos pelos cães com pesos entre os 21-32 kg (35,14%). Os cães com menor representação são aqueles com pesos compreendidos entre os 45-68 kg (8,11%). A média dos pesos dos cães

deste estudo é de 30 Kg, com uma mediana de 30 Kg e um desvio padrão de +/- 11,66 Kg. Um dos cães não tinham o registo do peso.

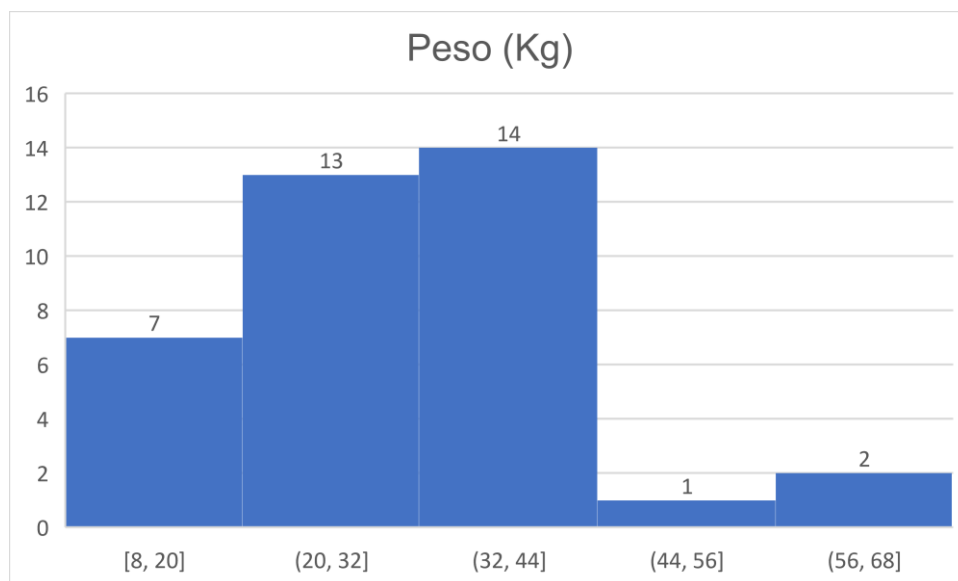


Figura 5- Distribuição dos pesos, em kg, de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia.

Relativamente ao sistema DEA 1 pode-se observar que neste estudo cerca de 37% (n= 14) dos animais eram portadores do tipo sanguíneo DEA 1 negativo e cerca de 16% (n= 6) apresentam tipo sanguíneo DEA 1 positivo. Não foi possível obter informação quanto ao tipo sanguíneo em 18 animais (47,4%).

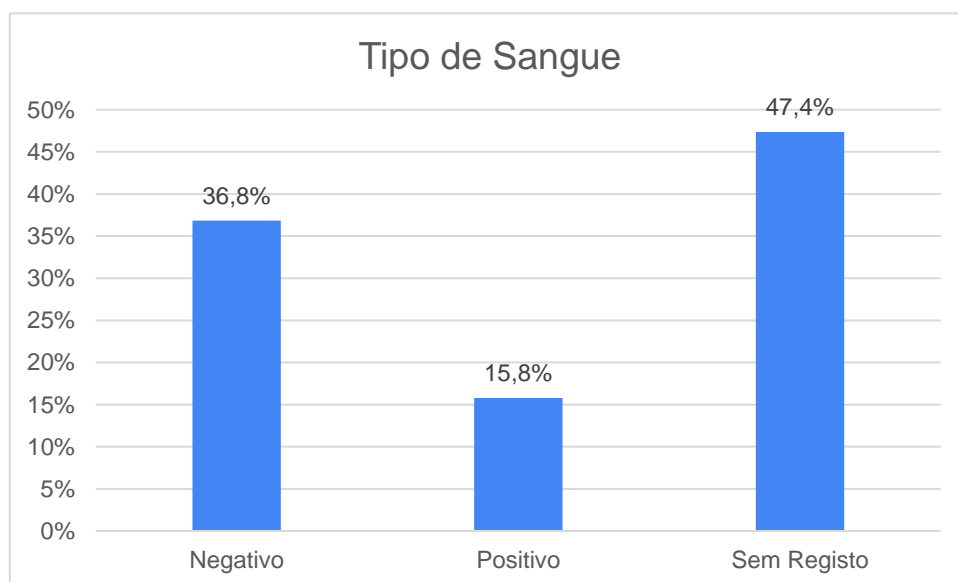


Figura 6- Distribuição dos tipos de sangue de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Foi classificado como "Sem Registos" todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas. Positivo- animais com tipo sanguíneo DEA 1 positivo; Negativo- Animais com tipo sanguíneo DEA 1 negativo.

No final da recolha dos dados, cerca de 87% (n=33) dos animais do estudo já tinham morrido, devido ao hemangiossarcoma. Apenas 5 dos animais (13,2%) ainda se encontravam vivos (29/02/2022).

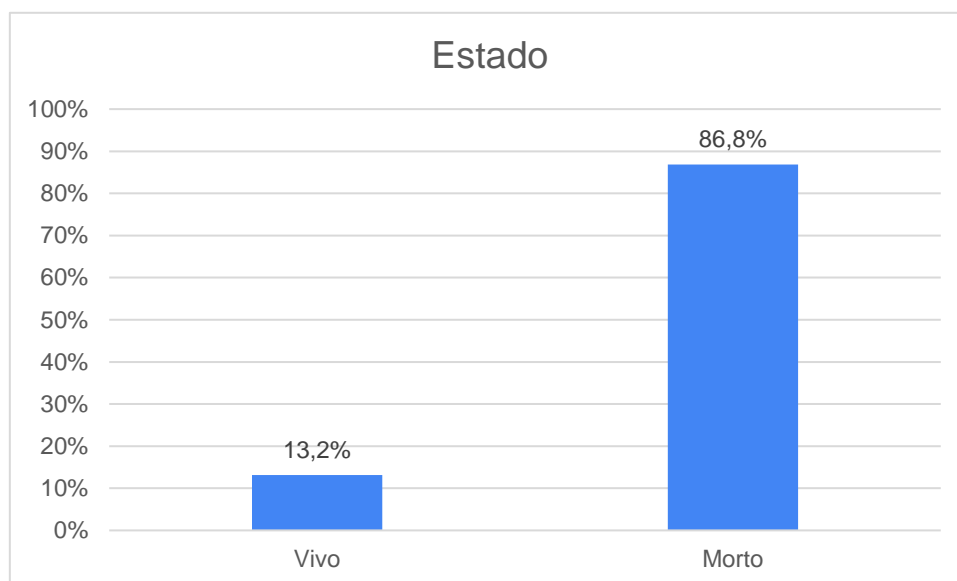


Figura 7- Distribuição do estado de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico, submetidos a esplenectomia.

1.2. Caracterização da apresentação clínica

A maioria dos animais apresentou hemoperitoneu (73,7% (n=28)) e apenas uma pequena parte não apresentou esta ocorrência (15,8%(n=6)). É ainda de registar que cerca de 10,5% dos animais não apresentavam nos registos do sistema qualquer referência a hemoabdómen.

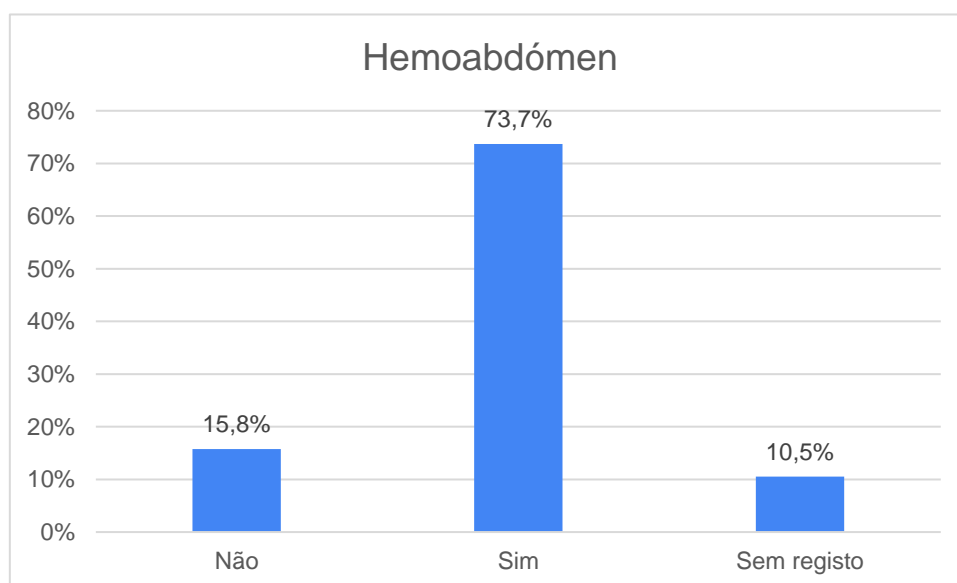


Figura 8- Distribuição da presença de hemoabdómen de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplénico, submetidos a esplenectomia. Foi classificado como "Sem Registos" todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas. Sim- Presença de hemoabdómen; Não- Ausência de hemoabdómen.

Cerca de 42% (n= 16) dos 38 animais apresentaram leucocitose e cerca de 39,5% (n= 15) apresentaram valores dentro da normalidade. Não foram encontrados resultados da contagem de leucócitos em quase 18,5% dos cães (n= 7).

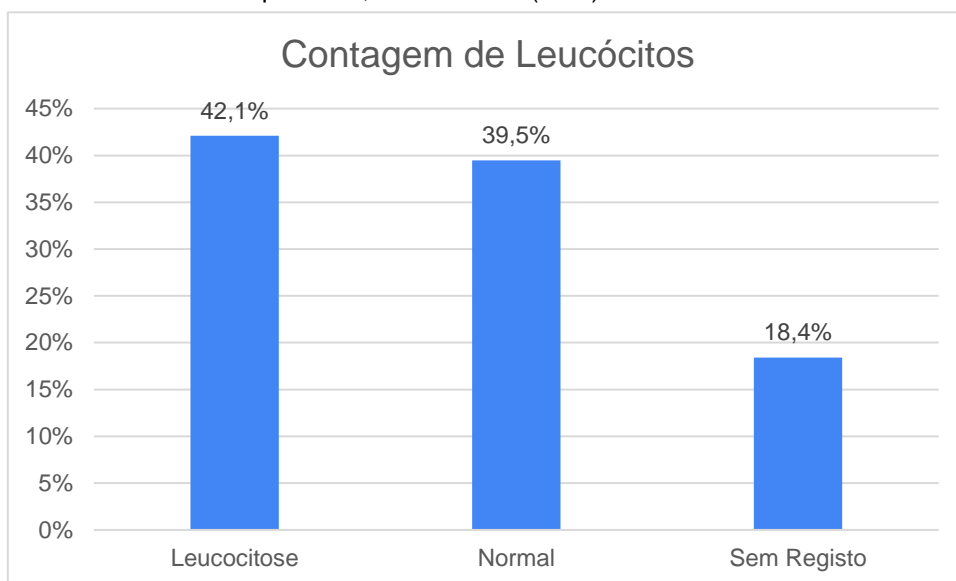


Figura 9- Distribuição da contagem de leucócitos de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Normal: 6.00-17.00; Leucocitose: >17.00 e Leucopénia: <6.00. Medido em $10^9/L$. Foi classificado como "Sem Registos" todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas.

Quando falamos especificamente em contagem de linfócitos observa-se que apenas 2,6% (n= 1) dos cães apresentavam linfocitose e que 10,5% (n= 4) apresentavam linfopénia, enquanto 68,4% (n= 26) tinham uma contagem normal de linfócitos em circulação. Cerca de 18% (n= 7) dos cães não apresentava qualquer registo de contagem de linfócitos.

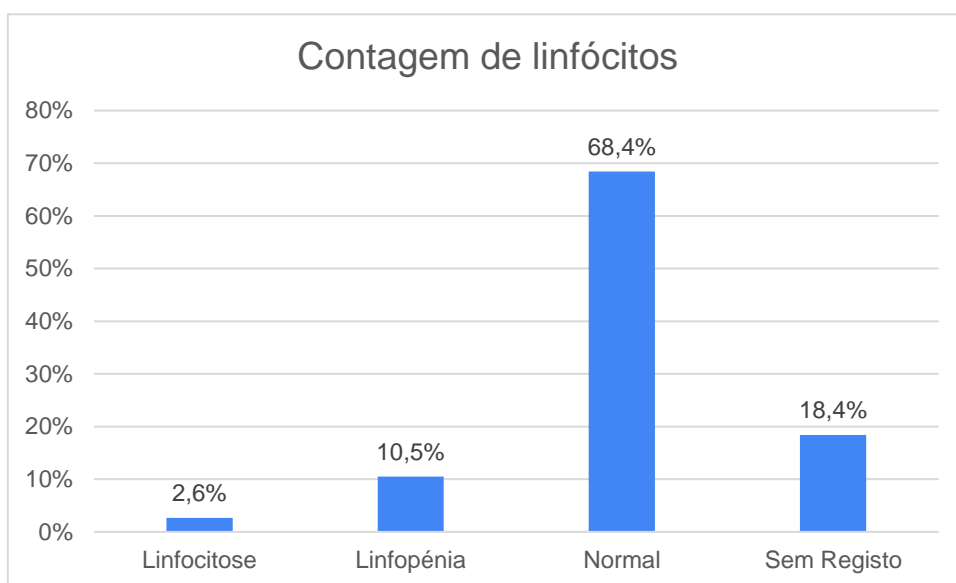


Figura 10- Distribuição da contagem de linfócitos de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Normal: 0.83-4.91; Linfocitose: >4.91 e Linfopénia: <0.83. Medido em $10^9/L$. Foi classificado como "Sem Registos" todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas.

Quanto à contagem de monócitos observa-se que cerca de 84% (n= 32) dos animais apresentavam uma contagem normal e os restantes não apresentavam qualquer registo nas bases de dados do Centro Hospitalar Veterinário.

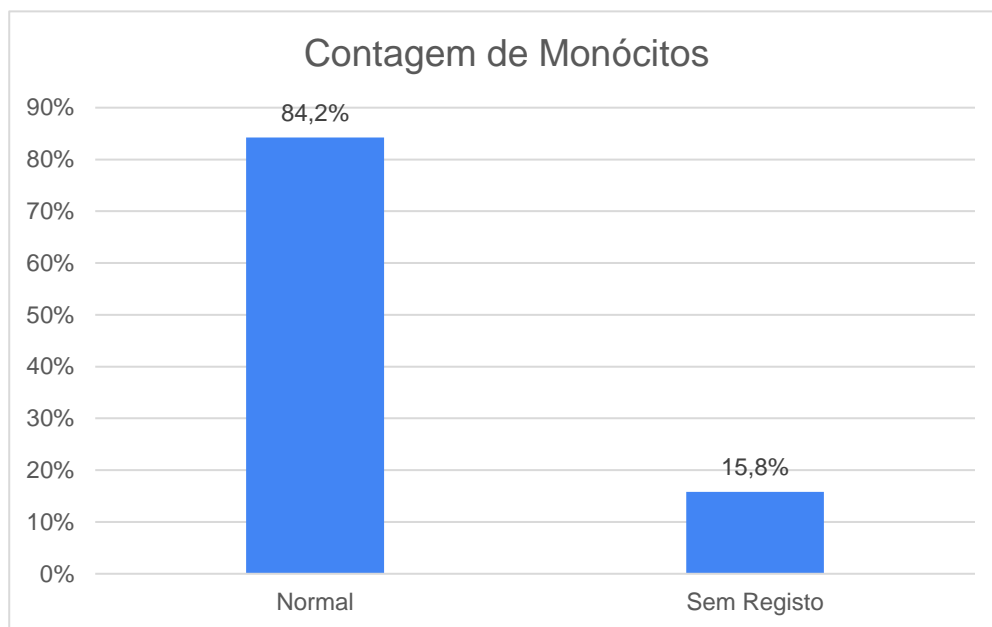


Figura 11- Distribuição da contagem de monócitos de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Normal: 0.14-1.97 e Monocitose: >1.97. Medido em $10^9/L$. Foi classificado como "Sem Registos" todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas.

Quanto aos parâmetros relativos ao eritrograma (contagem de eritrócitos (RBC), Hematócrito (HTC) e Hemoglobina (HGB)) observa-se que grande parte dos animais apresentava estes valores inferiores ao intervalo de referência (RBC= 55,26%; HTC= 44,74%; HGB= 63,16%). Pode-se então admitir que sendo a anemia um sinal clínico em que é observada diminuição do número de eritrócitos no sangue e/ou diminuição da quantidade de hemoglobina, existem mais animais apresentando esta condição. Uma grande percentagem dos animais, 18,42%, não apresentava qualquer registo sobre estes parâmetros nas bases de dados.

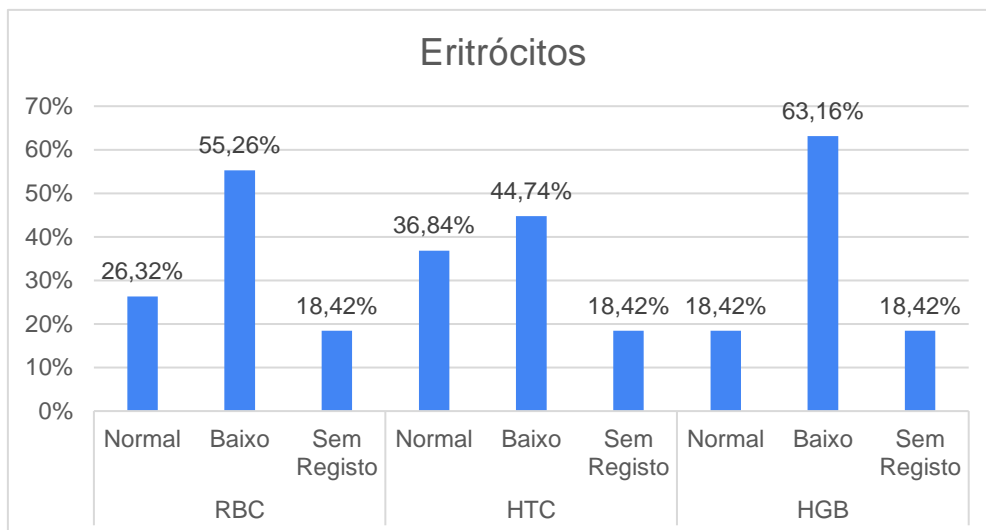


Figura 12- Distribuição dos parâmetros relativos aos eritrócitos de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. RBC- contagem de eritrócitos; HTC- hematócrito; HGB- hemoglobina. Para RBC, Normal: 5.10-8.50; Alto: >8.50 e Baixo: <5.10 (medido em $10^{12}/L$). Para HTC, Normal: 0.330-0.560; Alto: >0.560 e Baixo: <0.330. Para HGB, Normal: 110-190; Alto: >190 e Baixo: <110 (medido em g/L). Foi classificado como "Sem Registos" todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas.

Ainda nos parâmetros relativos ao hemograma foi observado que cerca de 42% (n= 16) dos animais deste estudo apresentavam trombocitopénia (diminuição da contagem de plaquetas) e 5,3% (n= 2) apresentavam trombocitose (aumento da contagem de plaquetas). Dos 38 cães cerca de 34% (n= 13) apresentavam esta contagem dentro dos parâmetros normais e 18,4% (n= 7) não apresentavam qualquer registo.

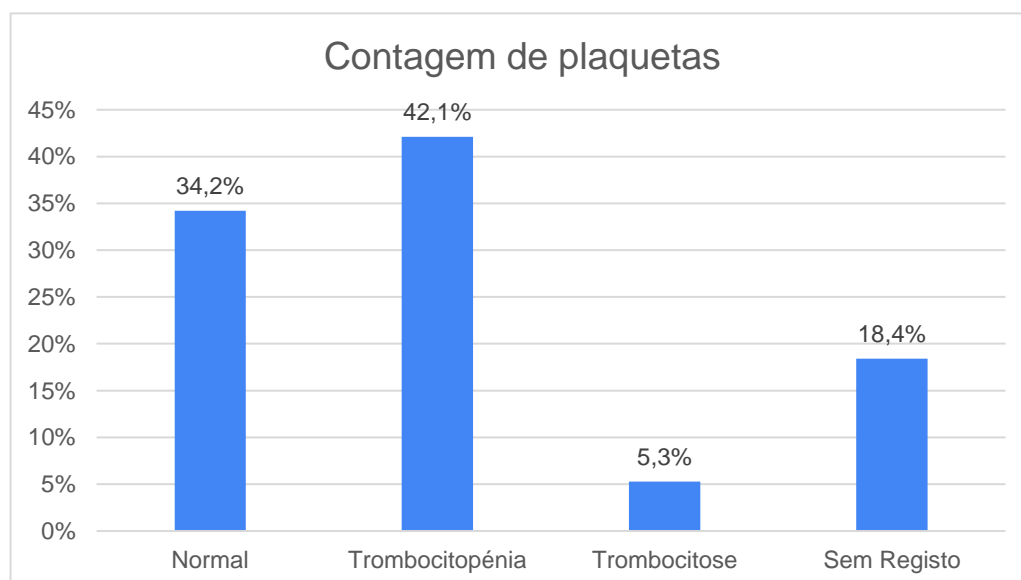


Figura 13- Distribuição da contagem de plaquetas de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Normal: 117-490; Trombocitose: >490 e Trombocitopénia: <110. Medido em $10^9/L$. Foi classificado como "Sem Registos" todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas.

1.3. Caracterização da terapêutica

Nos cães incluídos neste estudo, 22 (57,9%) realizaram transfusão de componentes sanguíneos (concentrado de eritrócitos e/ou plasma fresco congelado) em alguma fase da sua doença e apenas 11 animais (28,9%) não realizaram qualquer tipo de transfusão. Em 5 dos 38 animais (13,2%) não se encontra registado se realizaram ou não transfusão.

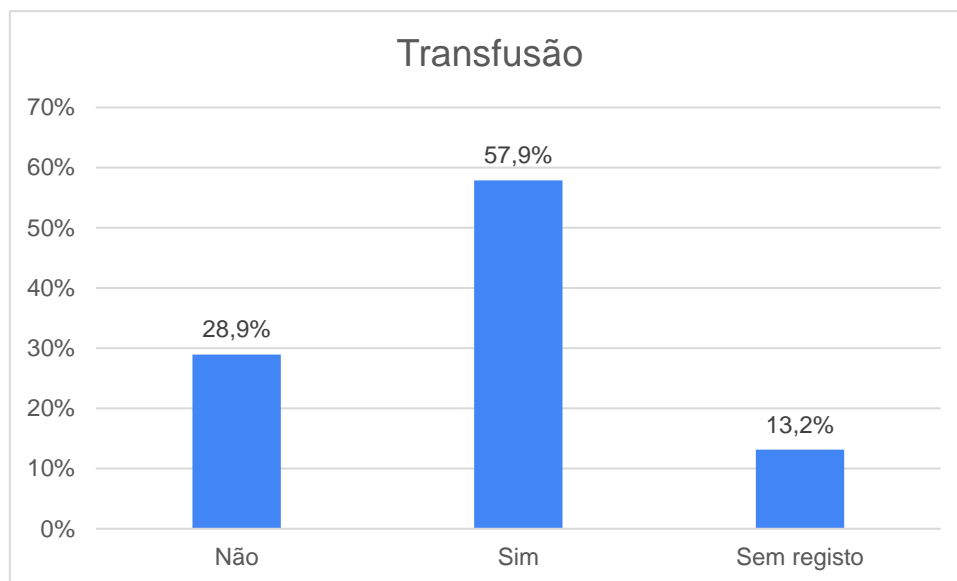


Figura 14- Distribuição da realização de transfusão sanguínea de cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Foi classificado como "Sem Registos" todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas. Sim- Realização de transfusão sanguínea; Não- Não realização de transfusão sanguínea.

Observando o tratamento realizado pelos animais, pode-se constatar que cerca de 47% dos animais não realizaram tratamento adjuvante com quimioterapia, apenas tendo realizado esplenectomia ("nenhum"). O protocolo de quimioterapia mais utilizado (18,4%; n=7) foi a junção de ciclofosfamida com um anti-inflamatório não esteróide inibidor da ciclooxigenase 2 ("Ciclo-Cox2). O segundo fármaco mais utilizado foi a doxorrubicina ("Dox") (13,2%; n=5). Apenas um animal (2,6%) realizou cada um dos seguintes tratamentos: ciclofosfamida ("Ciclo"), clorambucil ("Clora") e clorambucil em conjunto com um anti-inflamatório não esteróide inibidor da ciclooxigenase 2 ("Cox2-Clora"). Todos os animais deste estudo realizaram esplenectomia.

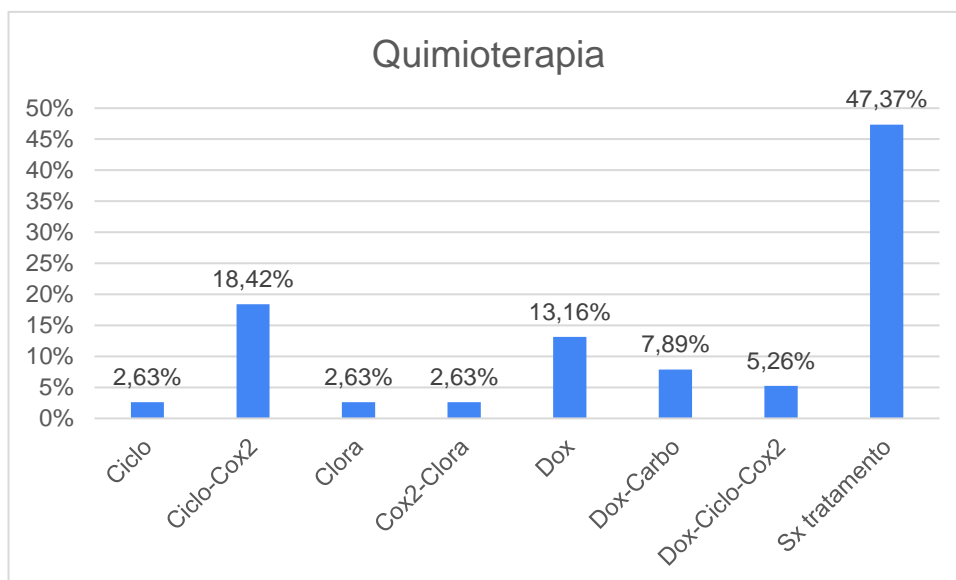


Figura 15- Distribuição do protocolo quimioterapêutico realizado em cães diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico, submetidos a esplenectomia. Foi classificado como "Sx tratamento" todos os animais que não apresentavam a informação sobre este parâmetro nas suas fichas clínicas. Ciclo- ciclofosfamida; Cox2- anti-inflamatório não esteroide inibidor da cicloxigenase 2; Clora- clorambucil; Dox- doxorubicina; Carbo- Carboplatina e Nenhum- apenas esplenectomia.

2. Análise estatística

2.1. Sexo

Ao comparar a sobrevivência entre machos e fêmeas verifica-se não existir diferenças significativas ($p= 0,981$) (tabela 3 e figura 16), isto reflete tempos médios de sobrevivência similares entre os dois sexos (234 dias nas fêmeas e 284 dias nos machos, tabela 3) e ainda a mediana do tempo de sobrevivência igual (108 dias, tabela 3). É possível verificar ainda que as curvas de sobrevivência são praticamente colineares (figura 16), demonstrando a ausência de uma diferença entre os sexos.

Tabela 3- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazard Ratio da variável Sexo. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazard Ratio. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor padrão. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.

	Sexo	
	Fêmea (n=21)	Macho (n=17)
Tempo Médio de Sobrevivência	233,9	283,7
Mediana do Tempo de Sobrevivência	108	108
M	15	14
C	0,518 ($\pm 0,054$)	
Hazard Ratio	-	-1%
p	-	0,981

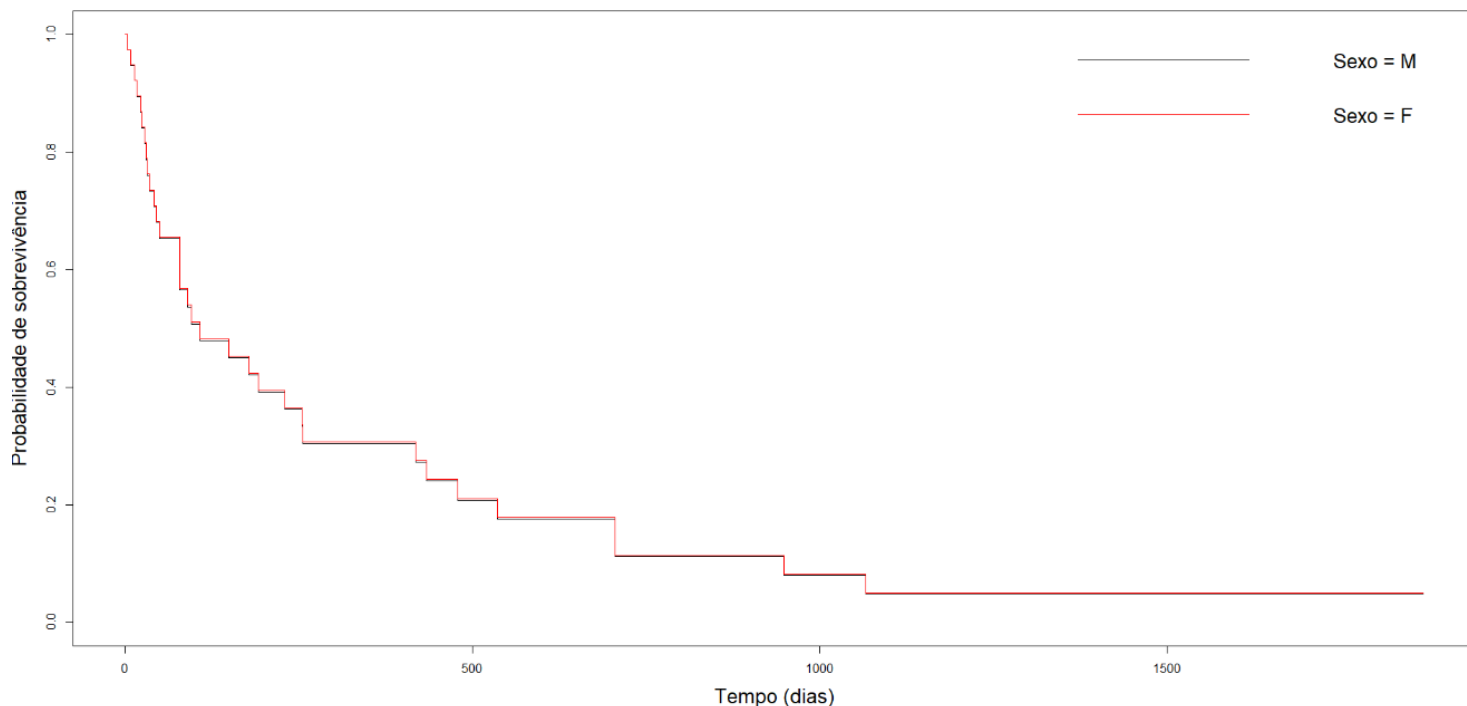


Figura 16- Curvas de sobrevivência da variável Sexo. M- Macho e F-Fêmea

2.2. Raça

Ao analisar as raças foi considerado como valor comparativo os cães sem raça definida ("SRD"), uma vez que este conjunto de cães incorpora não só os cães que não tinham a raça registrada no sistema, mas também cães cruzados, o que torna este grupo ideal para comparar com as raças puras.

No que diz respeito à raça, verifica-se que, comparativamente aos cães SRD, existem diferenças significativas nas raças Dogue Alemão ($p= 0,000293$), Leão da Rodésia ($p=0,020263$) e Pastor Alemão ($p= 0,006796$) (tabela 4). Assim sendo, de acordo com os valores de hazard ratio, existe um pior prognóstico de sobrevivência, em dias de vida, nestas mesmas raças (percentagens acima de 0% são indicativas de menor tempo de sobrevivência) (tabela 4). Estas raças apresentam tempos médios de sobrevivência inferiores às restantes raças (a variar entre 12,5-36,75 dias) (tabela 4). Analisando a figura 17, observa-se que, com o decorrer do tempo após o diagnóstico de hemangiossarcoma esplênico, as três raças em questão apresentam uma probabilidade de sobrevivência muito baixa, seguidas pelos animais de raça Boxer. Por fim, é de referir, que no caso da raça Cocker Spaniel Inglês não foi possível calcular o hazard ratio nem o p -value devido ao único exemplar desta raça ter apresentado um tempo de vida após o diagnóstico muito curto (3 dias) (tabela 4). Assim, os restantes parâmetros foram calculados pelo modelo estatístico tendo por base os valores dos cães SRD. As restantes raças não apresentaram diferenças significativas, pelo que os seus hazard ratios não devem ser interpretados.

Tabela 4- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Raça. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor padrão. Os valores significativos encontram-se assinalados por *. SRD- cães sem raça definida que incluem cães cruzados e cães sem registo da raça.

	Raça								
	Boxer (n= 2)	Bulldog Francês (n=1)	Cocker Spaniel Inglês (n=1)	Dogue Alemão (n= 2)	Golden Retriever (n=3)	Labrador (n=13)	Leão da Rodésia (n= 1)	Pastor Alemão (n= 4)	SRD (n=11)
Tempo Médio de Sobrevivência	130	418	3	12,5	147,33	356,71	28	36,75	305,18
Mediana do Tempo de Sobrevivência	79	230	192	8	149	230	24	31	192
M	2	1	1	2	2	11	1	3	10
C	0,688 ($\pm 0,064$)								
Hazard Ratio	134%	-6,70%	NA	12182%	23%	-11%	1585%	655%	-
p	0,287821	0,948064	NA	0,000293*	0,793789	0,805786	0,020263*	0,006796*	-

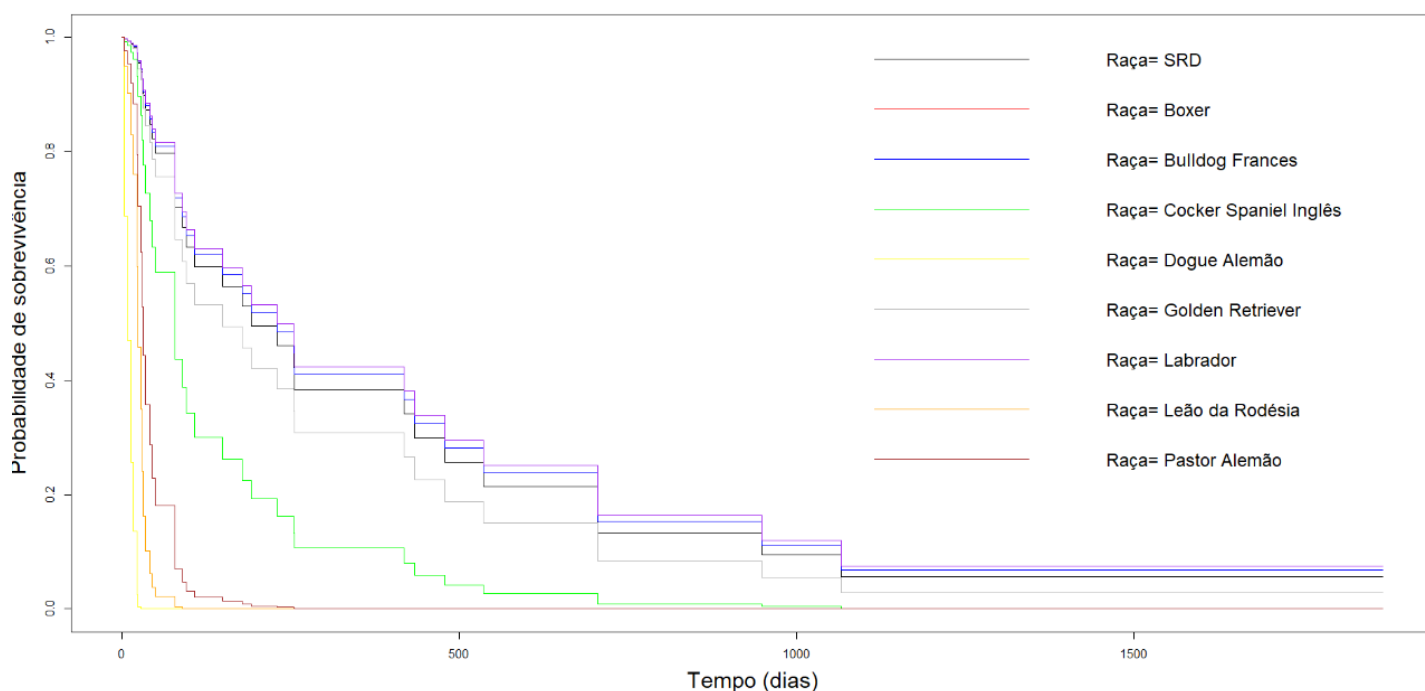


Figura 17- Curvas de sobrevivência da variável Raça. SRD- cães sem raça definida que incluem cães cruzados e cães sem registo da raça.

2.3. Idade

A figura 18 demonstra a relação entre a idade e a sobrevivência. Neste gráfico é possível observar que animais mais velhos apresentam uma menor sobrevivência, ainda que a diferença entre animais mais velhos e mais novos não seja muito acentuada. Isto é confirmado pela análise estatística, em que a sobrevivência não é afetada pela idade ($p= 0,588$; tabela 5), demonstrando

também pelo valor da concordância muito próximo de 0.5 (0.533), que indica alguma aleatoriedade na construção do modelo estatístico.

*Tabela 5- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio das variáveis Idade e Peso. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor com menos uma unidade (menos 1 ano ou 1kg). Os valores significativos encontram-se assinalados por *.*

	Idade (n= 38)	Peso (n=38)
M	33	33
C	0,533 ($\pm 0,074$)	0,621 ($\pm 0,064$)
Hazard Ratio	4%	3,35%
<i>p</i>	0,588	0,0443*

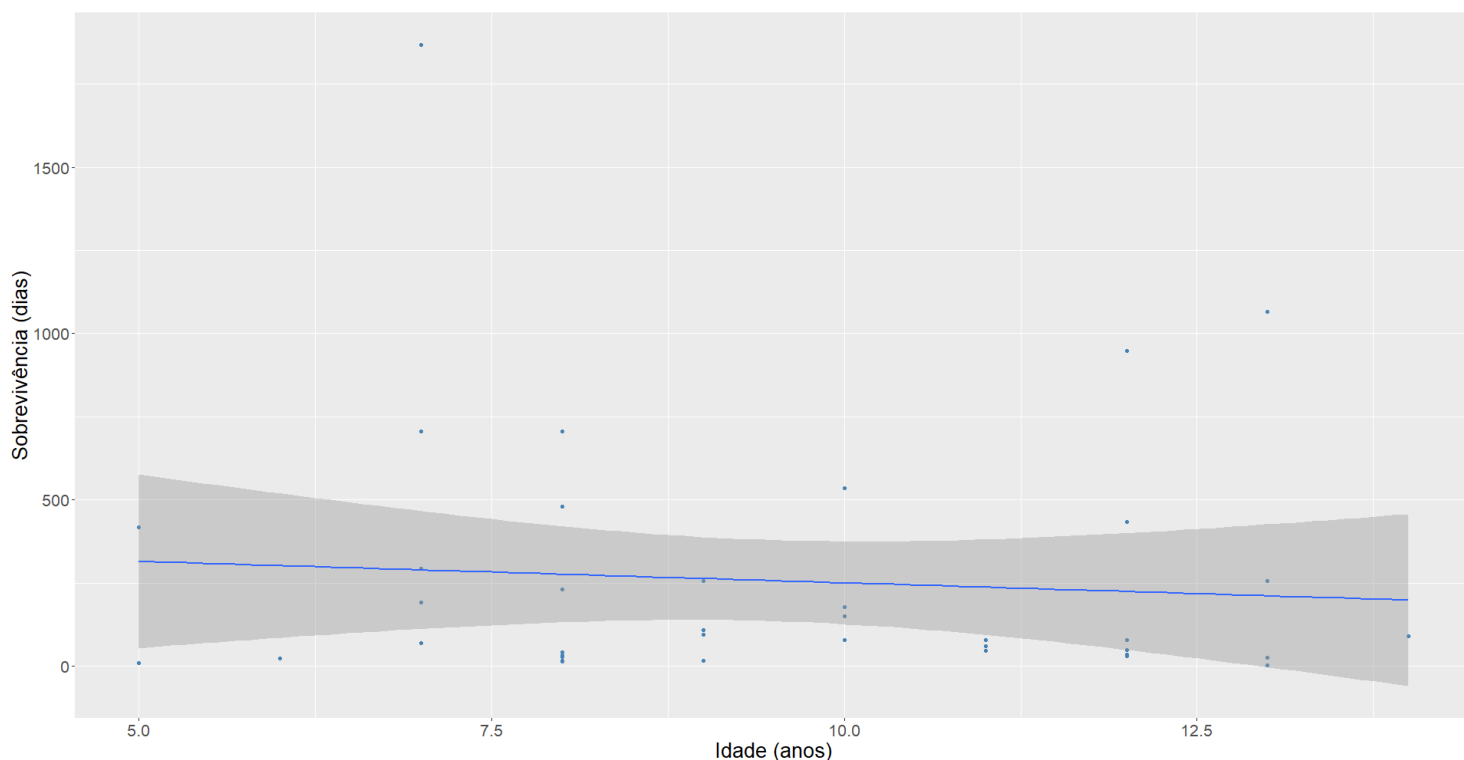


Figura 18- Representação gráfica da tendência linear da Sobrevivência, em dias, com a variação da Idade, em anos.

2.4. Peso

Ao contrário da idade, o fator peso dos animais (em Kg) demonstrou ser significativo para a sobrevivência de cães com hemangiossarcoma esplênico ($p=0,0443$; tabela 5), apresentando um hazard ratio de 3,35%, que significa que um cão 1Kg mais pesado apresenta uma probabilidade de morrer 3,35% superior comparando a um cão com menos 1 kg. Assim, em cães mais pesados a sobrevivência após o diagnóstico é menor (figura 19).

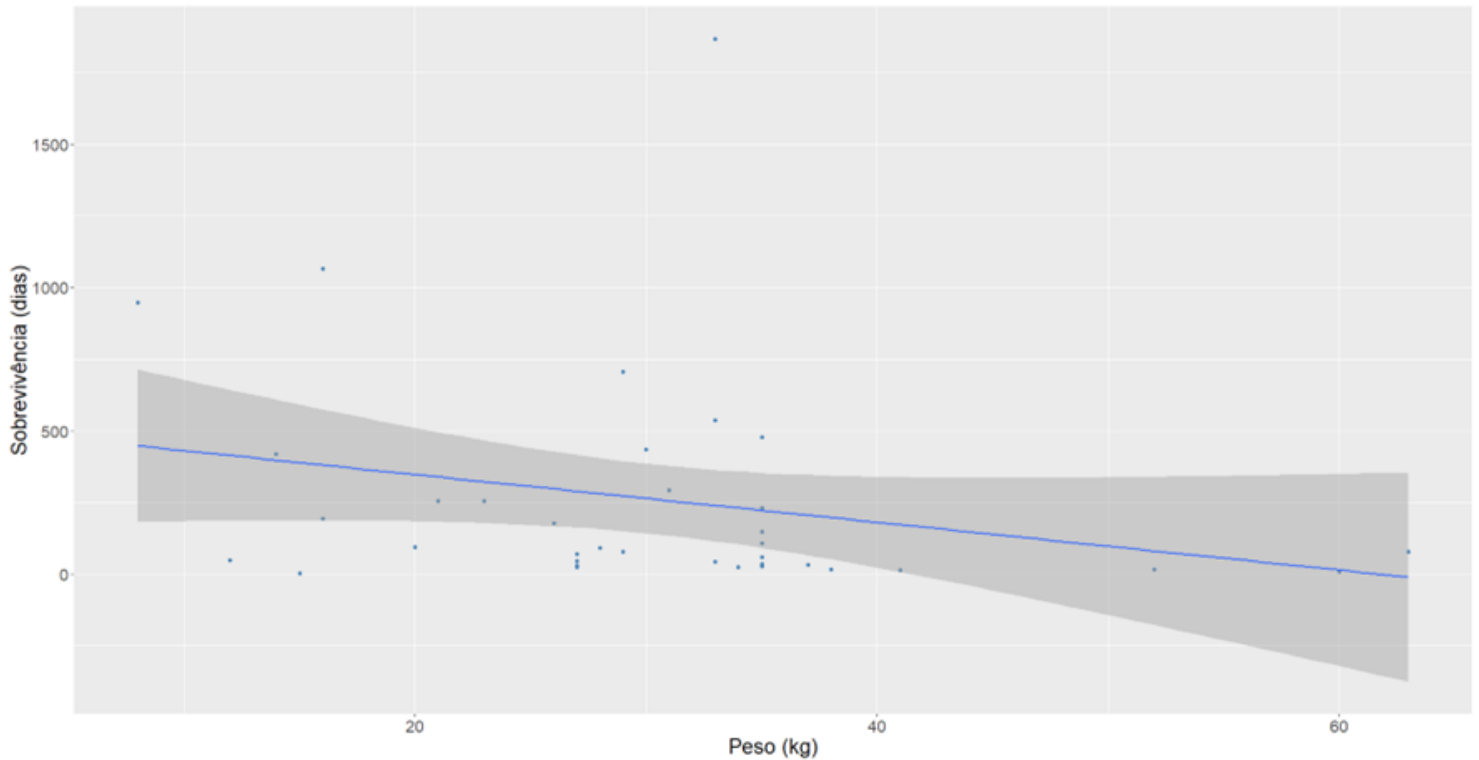


Figura 19- Representação gráfica da tendência linear da Sobrevivência, em dias, com a variação do Peso, em kg.

2.5. Tipo de Sangue

Quando considerado o sistema DEA1, constatam-se diferenças no tempo médio de sobrevivência entre o tipo sanguíneo DEA1 negativo (329 dias) e o tipo sanguíneo DEA1 positivo (35 dias), sendo que esta diferença é significativa ($p=0,00728$). Deste modo, e considerando o hazard ratio, a sobrevivência dos cães DEA1 positivos é menor (tabela 6, figura 20).

Tabela 6- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Tipo de Sangue. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Rati; p-valor de significância o. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *. Positivo- Tipo sanguíneo DEA 1 positivo e Negativo- tipo sanguíneo DEA 1 negativo.

	Tipo de sangue	
	Negativo (n= 14)	Positivo (n=6)
Tempo Médio de Sobrevivência	329,14	34,83
Mediana do Tempo de Sobrevivência	192	24
M	10	6
C	0,673 ($\pm 0,058$)	
Hazard Ratio	-	488%
p	-	0,00728*

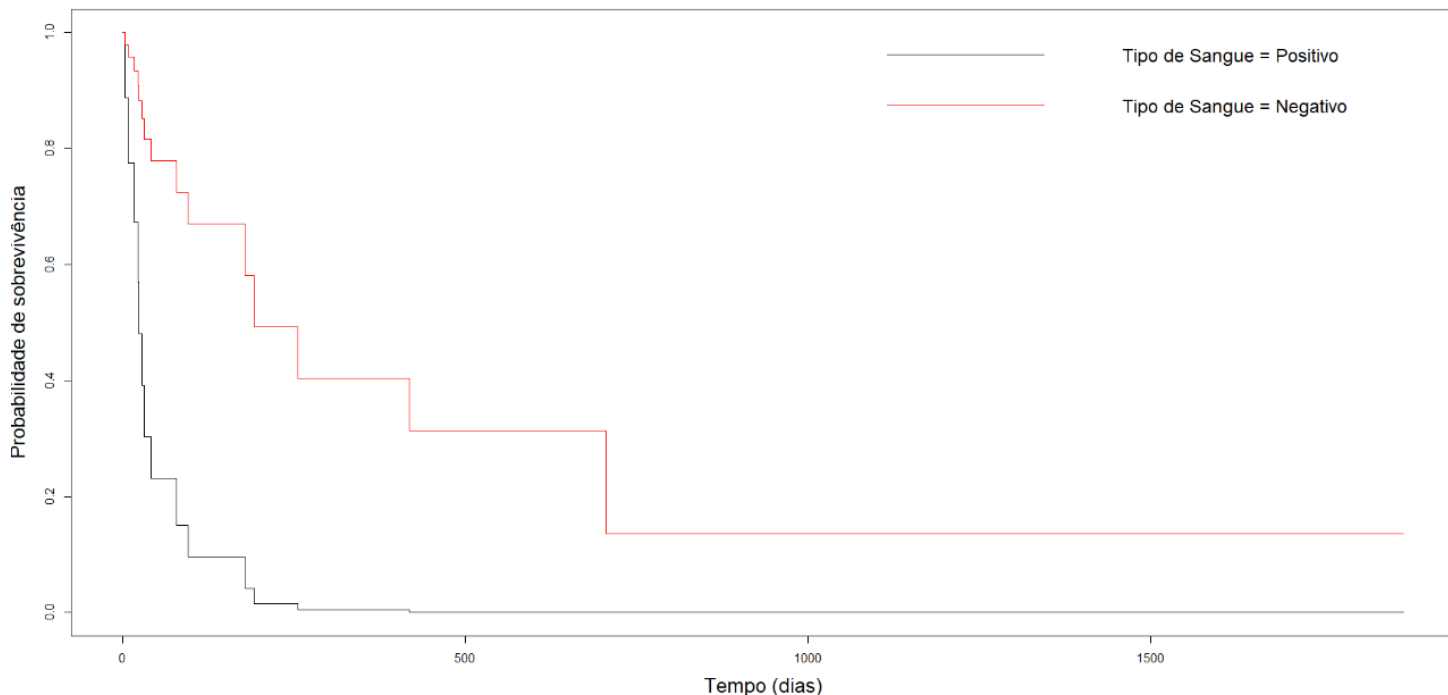


Figura 20- Curvas de sobrevivência da variável Tipo de Sangue. Positivo- Tipo sanguíneo DEA 1 positivo e Negativo- tipo sanguíneo DEA 1 negativo.

2.6. Hemograma

Na análise estatística dos parâmetros do hemograma não foi utilizada a variável Mon (Monócitos), uma vez que em todos os animais os valores se encontravam dentro dos valores de referência. Através de um teste de correlação de pearson, sabe-se que existe uma elevada correlação entre as variáveis HGB, HTC e RBC (superior a 95%), significando isto que estas variáveis apresentam um valor explicativo bastante semelhante.

Nenhum dos seis parâmetros do hemograma analisados (HTC, RBC, HGB, WBC, Lym e PLT) demonstraram diferenças significativas (tabela 7). Para além disto, numa análise mais detalhada da concordância dos modelos (C), observa-se que estas se encontram muito perto de 0,5, que é um sinal de que os resultados do modelo se distribuem de forma aleatória, o que demarca a ausência de um padrão (tabela 7). Já nas curvas de sobrevivência, existe grande semelhança entre as curvas dos valores de referência e as curvas dos valores fora deste intervalo (figura 21A, B e D e figura 22 A e B). Exceção feita à curva da linfocitose, que apresenta um claro distanciamento em relação à curva dos valores de referência, apresentando uma menor sobrevivência (figura 21C).

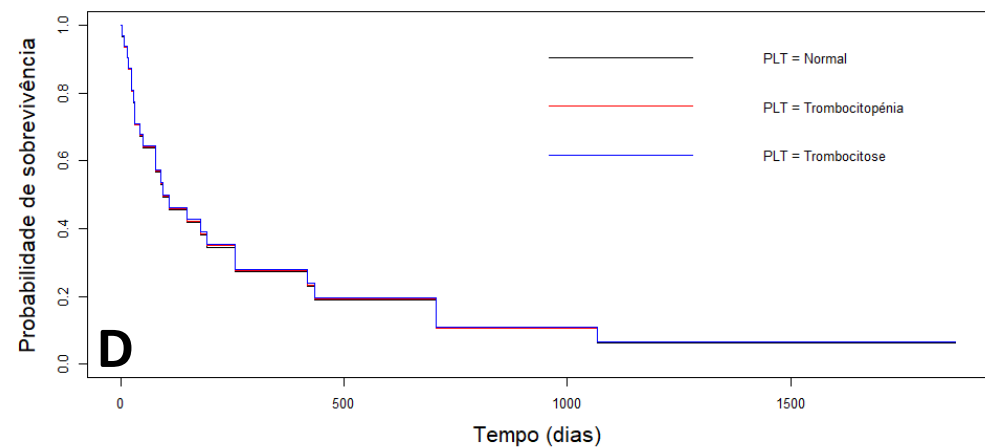
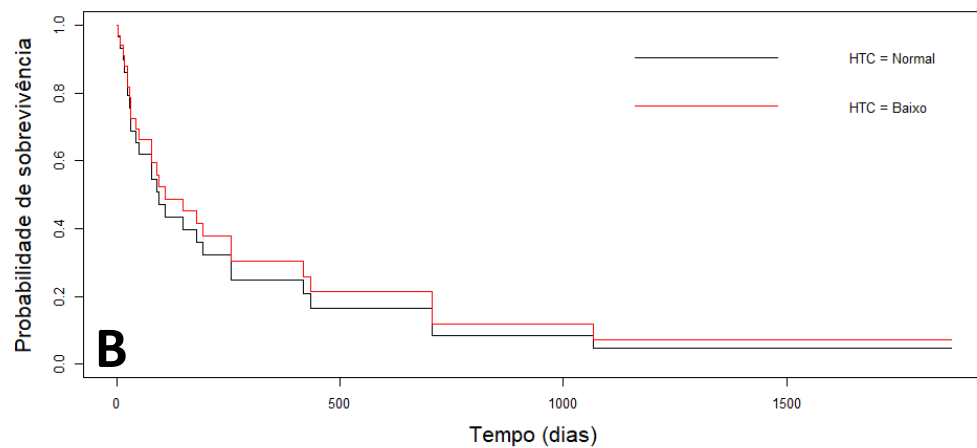
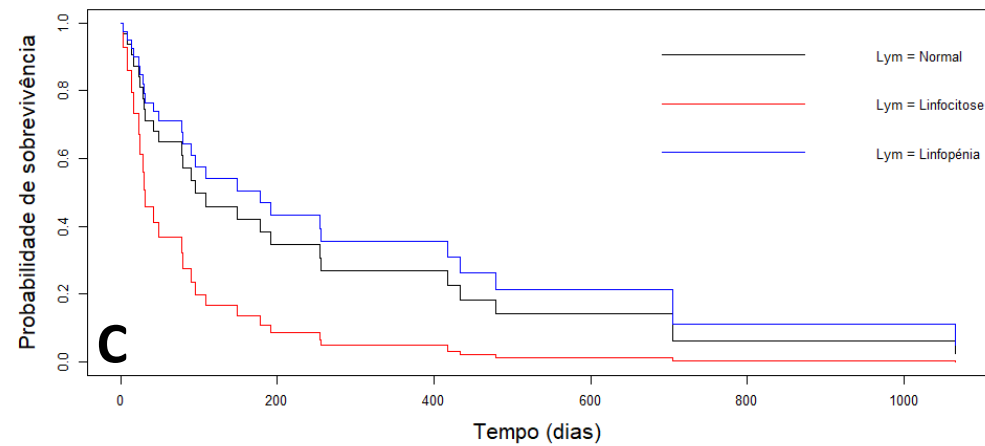
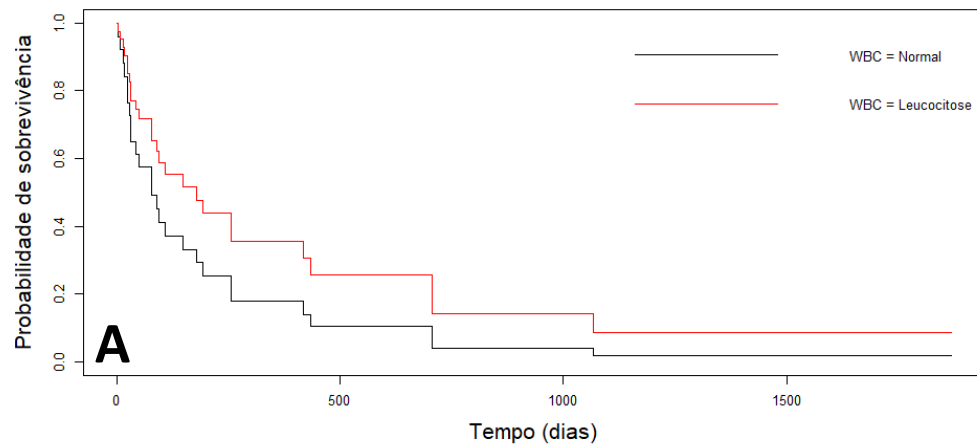


Figura 21- Curvas de sobrevivência da variáveis WBC, Lym, HCT e PLT. Para WBC, Normal: 6.00-17.00; Leucocitose: >17.00 e Leucopénia: <6.00. Para Lym, Normal: 0.83-4.91; Linfocitose: >4.91 e Linfopénia: <0.83. Para HTC, Normal: 0.330-0.560; Alto: >0.560 e baixo: <0.330. Para PLT, Normal: 117-490; Trombocitose: >490 e Trombocitopénia: <110. WBC, Lym e PLT medidos em $10^9/L$. HTC medido em g/L.

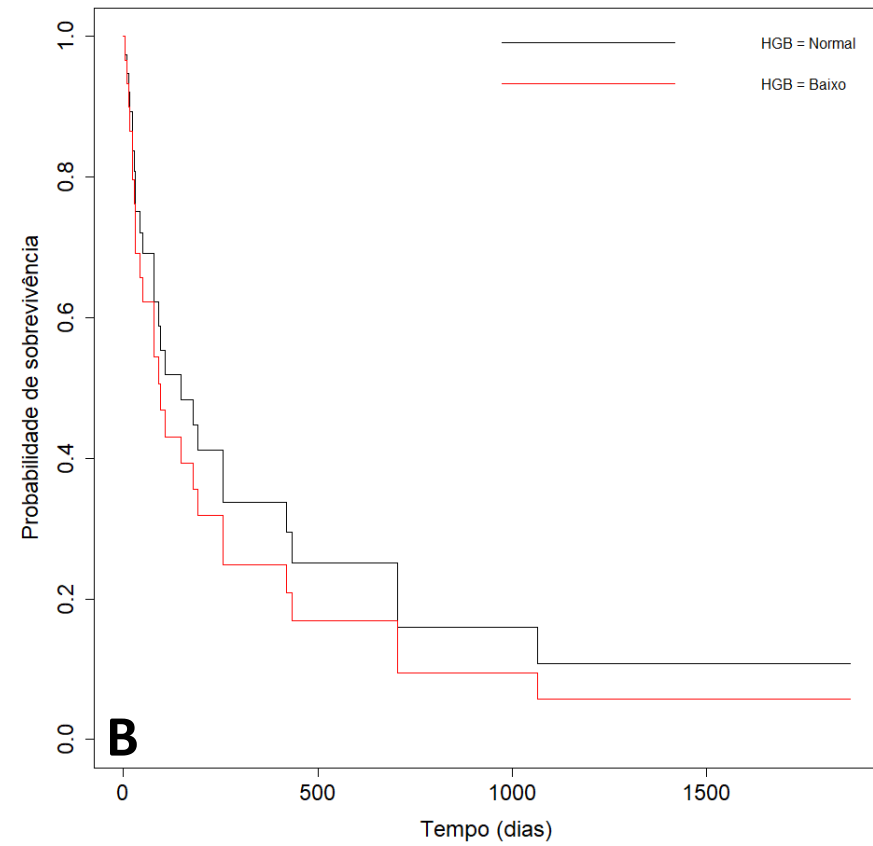
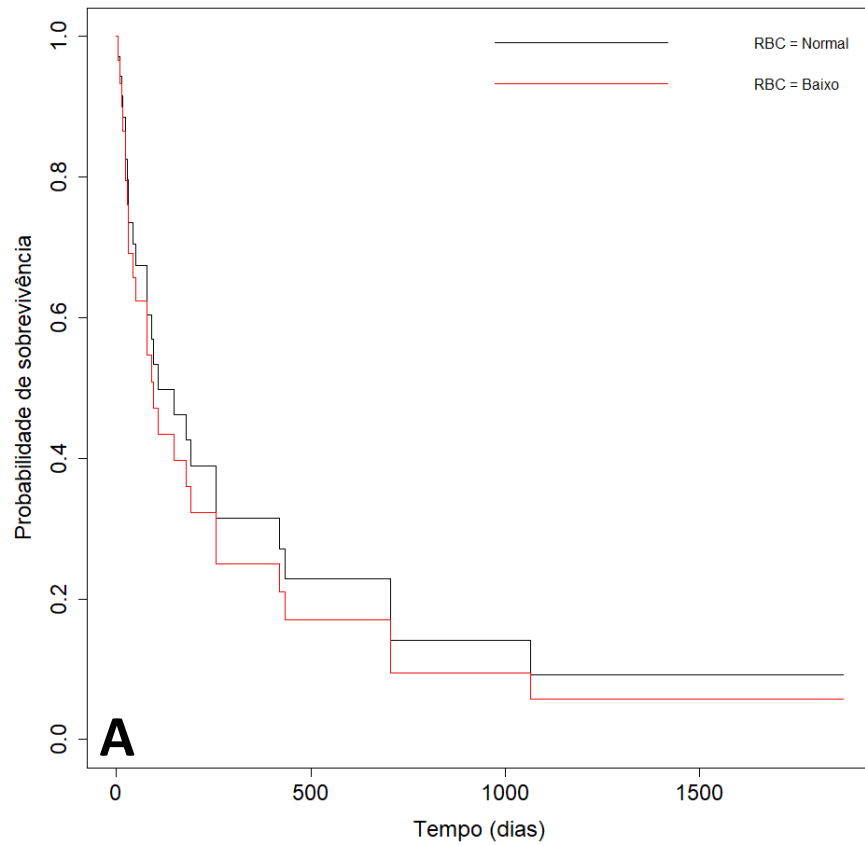


Figura 22- Curvas de sobrevivência da variáveis HGB e RBC. Para HGB, Normal: 110-190; HGB alta: >190 e HGB baixa: <110. Para RBC, Normal: 5.50-8.50; RBC alto: >8.50 e RBC baixo: <5.50. HGB medido em g/L e RBC medido em 10¹²/L.

Tabela 7- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio das variáveis WBC, Lym, HCT, PLT, HGB e RBC. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.

Variáveis	n	Tempo médio de sobrevivência	Mediana do tempo de sobrevivência	M	C	Hazard Ratio	p
WBC							
Normal	15	252,5	79	12	0,508	-	-
Leucocitose	16	358,6	178	14	(±0,061)	40,00%	0,24
Lym							
Normal	26	192,3	95	6	0,539	-	-
Linfopénia	4	236	178	3	(±0,004)	-21%	0,706
Linfocitose	1	49	31	1		130%	0,426
RBC							
Normal	10	191	108	8	0,556	-	-
Baixo	21	260	95	18	(±0,051)	20%	0,685
HTC							
Normal	14	160	95	12	0,466	-	-
Baixo	17	302,4	108	14	(±0,059)	-14%	0,719
HGB							
Normal	6	207	95	6	0,573	-	-
Baixo	20	247	149	20	(±0,053)	-22%	0,6
PLT							
Normal	13	203	95	11	0,495	-	-
Trombocitopénia	16	270	95	13	(±0,055)	-0,90%	0,983
Trombocitose	2	202	108	2		-2,10%	0,979

2.7. Hemoabdómen

À semelhança dos valores do hemograma, também a presença de hemoabdómen não afetou a sobrevivência de cães com hemangiossarcoma esplénico ($p= 0,931$; tabela 8). Neste caso, existe uma grande disparidade no tempo médio de sobrevivência entre a ocorrência e ausência de hemoabdómen, no entanto, as medianas do tempo de sobrevivência entre estes parâmetros têm o mesmo valor (95 dias). Mais uma vez, a ausência de diferenças significativas encontra-se representada graficamente pela colinearidade das curvas de sobrevivência (figura 22).

Tabela 8- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Hemoabdómen. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.

Hemoabdómen		
	Não (n= 6)	Sim (n=29)
Tempo Médio de Sobrevivência	144,7	305,7
Mediana do Tempo de Sobrevivência	95	95
M	4	25
C	0,514 (±0,042)	
Hazard Ratio	-	4,8%
p	-	0,931

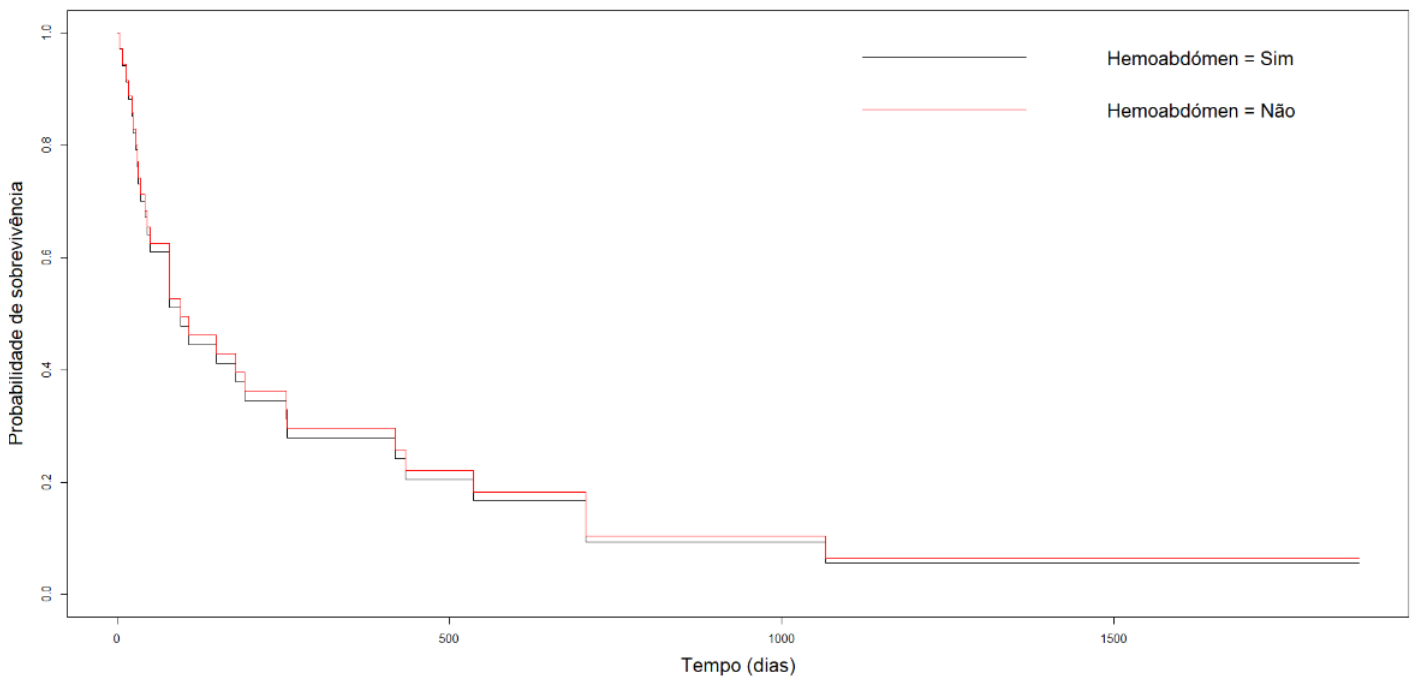


Figura 23- Curvas de sobrevivência da variável Hemoabdómen. Sim- Presença de hemoabdómen e Não- ausência de hemoabdómen.

2.8. Transfusão

A realização de uma transfusão (concentrado de eritrócitos e/ou plasma fresco congelado) em animais com hemangiossarcoma esplênico não foi um fator diferenciador na sobrevivência após o diagnóstico, em comparação com animais que não realizaram nenhuma

transusão (p=0,18; tabela 9). As curvas de sobrevivência apresentam uma elevada similaridade (figura 23), concordante com a ausência de diferenças significativas.

*Tabela 9- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Transusão. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.*

	Transusão	
	Não (n= 11)	Sim (n=22)
Tempo Médio de Sobrevivência	253	315,9
Mediana do Tempo de Sobrevivência	230	90
M	9	20
C	0,593 (±0,045)	
Hazard Ratio	-	75,8%
p	-	0,18

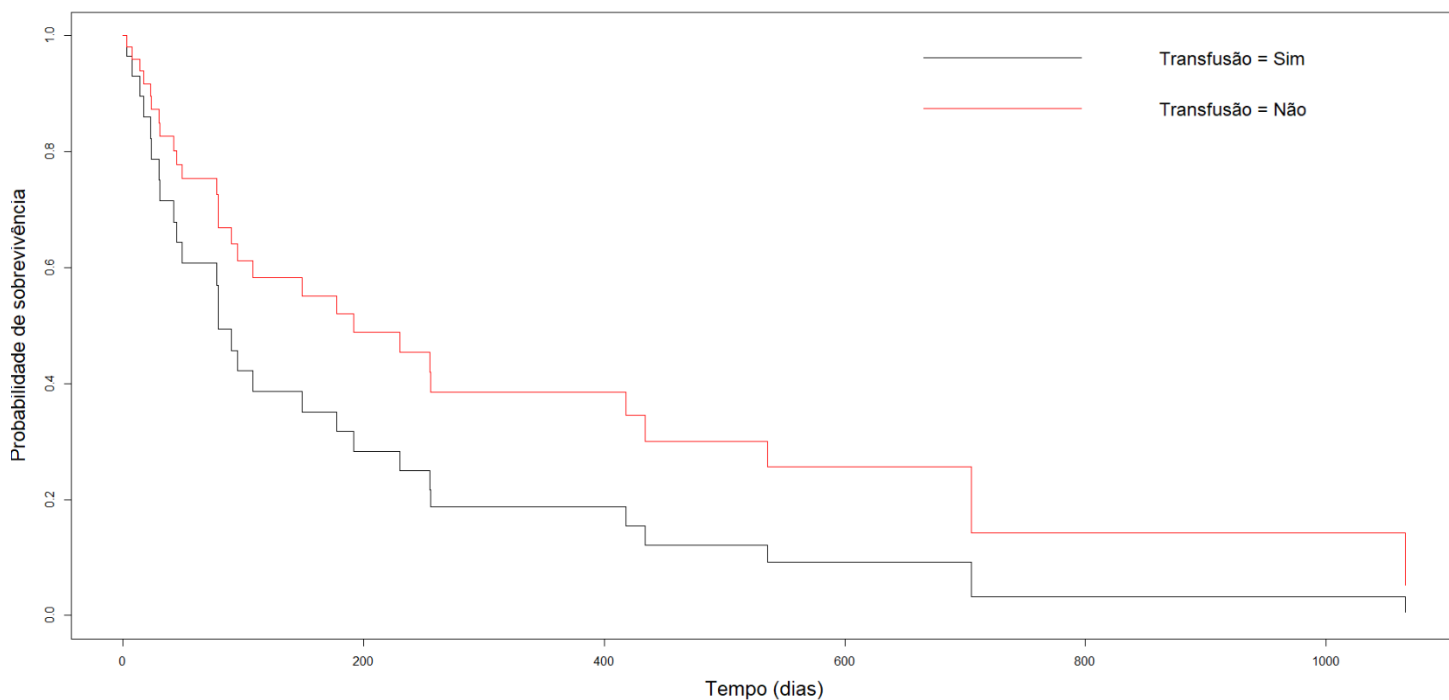


Figura 24- Curvas de sobrevivência da variável Transusão. Sim- Realização de transfusão sanguínea e Não- ausência de transfusão sanguínea.

2.9. Quimioterapia

No que respeita a quimioterapia, foi comparado à não realização de quimioterapia (“Sx tratamento”) com os diversos protocolos quimioterapêuticos. De relembrar que todos os animais neste estudo realizaram esplenectomia. Para as diversas combinações de fármacos não foram

encontradas diferenças significativas com a não realização de quimioterapia (tabela 10). As curvas de sobrevivência desta análise mostram a curva da não realização de quimioterapia no meio das restantes combinações de fármacos, no entanto as curvas não apresentam uma variação muito acentuada da curva “Sx tratamento” (figura 24).

Tabela 10- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Quimioterapia. M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.

Quimioterapia								
	Ciclo (n=1)	Ciclo-Cox2 (n=7)	Clora (n=1)	Cox2-Clora (n=1)	Dox (n=5)	Dox-Carbo (n=3)	Dox-Ciclo-Cox2 (n=2)	Sx tratamento (n= 18)
Tempo Médio de Sobrevivência	23	494,29	30	49	165,6	143,33	801	191
Mediana do Tempo de Sobrevivência	17	256	28	42	90	90	705	95
M	1	7	1	1	5	3	2	13
C	0,652 (±0,051)							
Hazard Ratio	800%	-51,01%	391%	145%	17%	11%	71,02%	-
p	0,0548	0,1447	0,1476	0,3997	0,7654	0,8693	0,1114	-

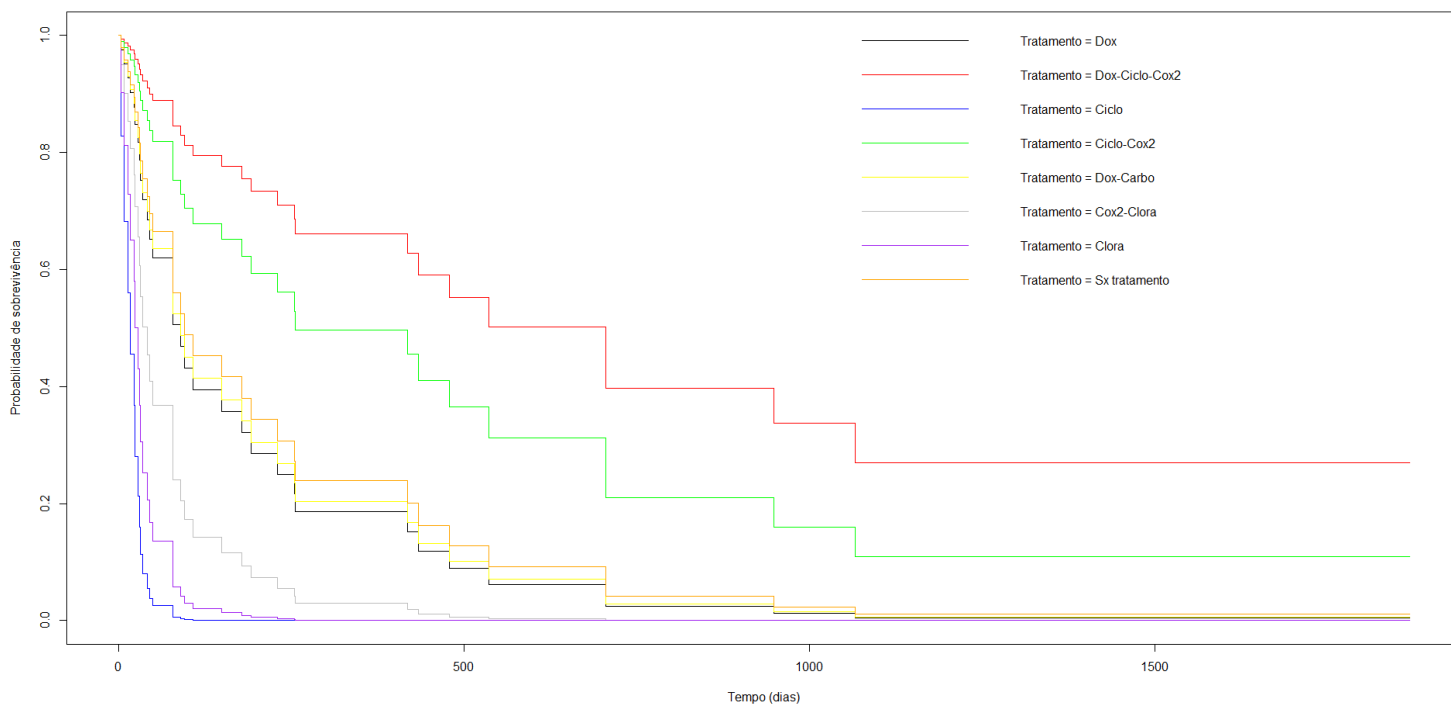


Figura 25- Curvas de sobrevivência da variável Quimioterapia. Ciclo- ciclofosfamida; Cox2- anti-inflamatório não esteroide inibidor da cicloxigenase 2; Clora- clorambucil; Dox- doxorubicina; Carbo- carboplatina e Sx tratamento- apenas esplenectomia.

Contudo, foi classificado como “Sx tratamento” sempre que não se encontrasse descrito no sistema o protocolo quimioterapêutico. Isto não invalida a possibilidade de realização de um tratamento e este não ter sido registado. Para fazer face a esta limitação foram excluídos os animais sem registo de quimioterapia e os protocolos quimioterapêuticos foram comparados ao protocolo padrão, a doxorubicina (Dox). Quando comparado à doxorubicina, tratamentos com Ciclo-Cox2 e com Dox-Ciclo-Cox2 foram mais eficazes ($p=0,0436$ e $p=0,0248$, respetivamente; tabela 11). Neste caso, um cão tratado com Ciclo-Cox2 apresenta 75,14% menor probabilidade de morrer quando comparado com Dox e um cão tratado com Dox-Ciclo-Cox2 apresenta 92,98% menor probabilidade de morrer quando comparado com Dox (tabela 11). Analisando as curvas de sobrevivência, conclui-se que a combinação de fármacos Ciclo-Cox2 e Dox-Ciclo-Cox2 resulta num maior tempo de vida, comparativamente às restantes combinações de fármacos (figura 25). É evidente ainda a baixa sobrevivência dos animais que realizaram quimioterapia com Clora e Ciclo (figura 25). A adição de um AINES-Cox2 com Clora, resultou num aumento da sobrevivência quando comparado à utilização de Clora isoladamente (figura 25). Não parece existir nenhum efeito ao ser adicionado carbo a um tratamento realizado com Dox (figura 25).

Tabela 11- Resultado da análise de sobrevivência Cox Hazards Ratio da variável Quimioterapia sem o tratamento Sx tratamento (apenas cirurgia). M- Número de animais mortos; C- concordância do modelo Cox Hazards Ratio; p-valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.

Quimioterapia							
	Ciclo (n= 1)	Ciclo-Cox2 (n=7)	Clora (n=1)	Cox2-Clora (n= 1)	Dox (n=5)	Dox-Carbo (n=3)	Dox-Ciclo-Cox2 (n= 2)
Tempo Médio de Sobrevivência	23	494,29	30	49	165,6	143,33	801
Mediana do Tempo de Sobrevivência	23	479	30	42	108	108	948
M	1	7	1	1	5	3	2
C				0,772 ($\pm 0,053$)			
Hazard Ratio	2284%	-75,14%	1070%	175%	-	-2,70%	-92,98%
p	0,0522	0,0436*	0,0949	0,4018	-	0,9710	0,0248*

2.10. Interação entre Peso, Raça, Tipo de Sangue e Quimioterapia

De modo a perceber se as variáveis que foram significativas individualmente tinham influência em conjunto, foi realizada uma análise que juntou o Tratamento, o Peso, a Raça e o Tipo de Sangue. O Tipo de Sangue foi posteriormente retirado, uma vez que o número de cães que tinham o tipo sanguíneo e todas as outras variáveis da análise registadas foi muito baixo ($n=7$), o que não permitia calcular o modelo.

Considerando a tabela 12 verifica-se que, quando considerado o tratamento e a raça, o peso deixa de ter uma influência na sobrevivência. Por outro lado, quando considerado o peso e a raça, os tratamentos Ciclo, Ciclo-Cox2 e Dox-Ciclo-Cox2 foram significativamente diferentes do tratamento com Dox (tabela 12). Os tratamentos com Ciclo-Cox2 e Dox-Ciclo-Cox2 melhoraram a sobrevivência em mais de 98%, ou seja, o tempo de sobrevivência aumenta (tabela 12). O tratamento com Ciclo obteve a pior sobrevivência, no entanto, o hazard ratio deverá estar sobrestimado devido ao $n=1$ (tabela 12). Em relação à raça, a raça Boxer e Labrador apresentaram os piores tempos de sobrevivência, quando considerado o efeito do peso e do tratamento (tabela 12). Não é possível ter um gráfico por uma das variáveis ser numérica e as outras duas categóricas.

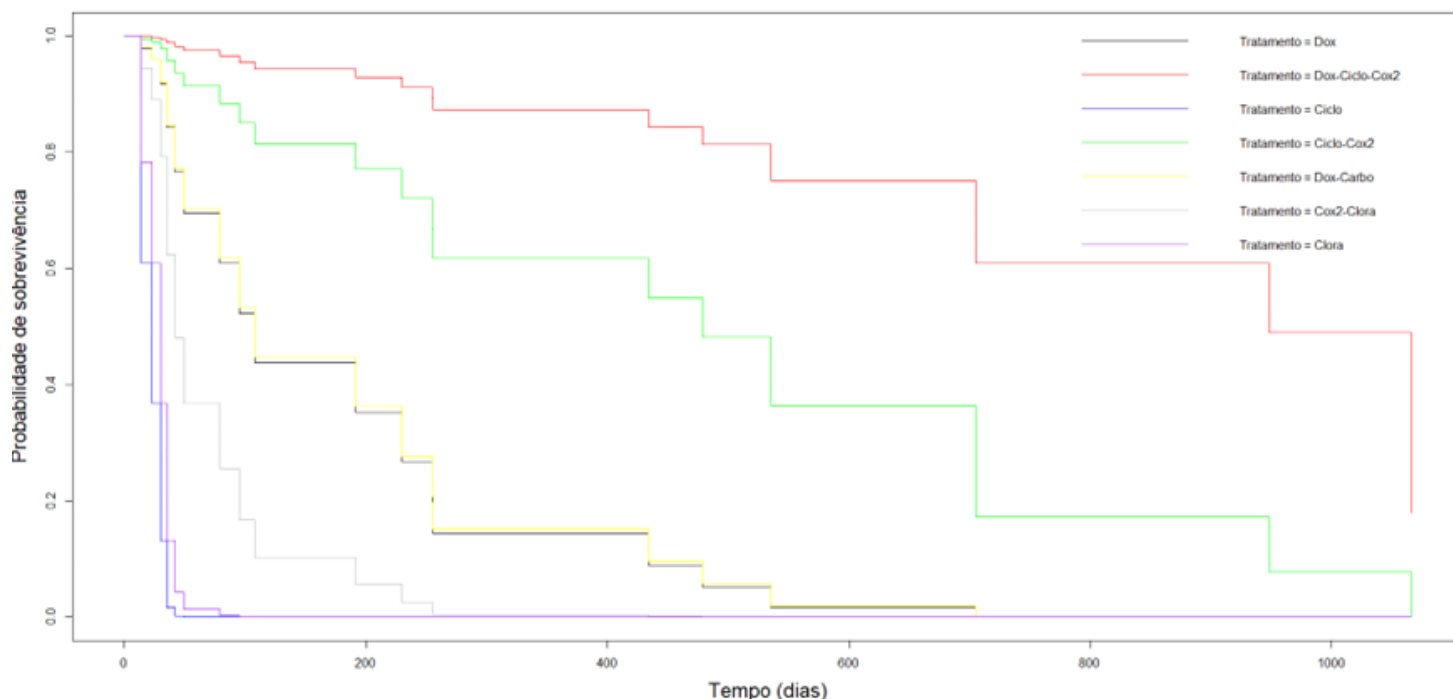


Figura 26- Curvas de sobrevivência da variável Quimioterapia. Ciclo- ciclofosfamida; Cox2- antiinflamatório não esteroide inibidor da cicloxigenase 2; Clora- clorambucil; Dox- doxorubicina e Carbo- carboplatina.

Tabela 12- Resultado da análise multivariada de sobrevivência Cox Hazards Ratio das variáveis Peso, Raça e Quimioterapia. M- Número de animais mortos; p- valor de significância. O hazard ratio corresponde à probabilidade de morrer face ao valor de referência. Os valores significativos encontram-se assinalados por *.

Interação: Peso + Quimioterapia + Raça (n=20)			
M		20	
		Hazard Ratio	z
			p
Peso		1,19%	-0,145
Quimioterapia			
	Dox	-	-
	Ciclo	19400%	2,656
	Ciclo-Cox2	-98,89%	-2,533
	Clora	-60,34%	-0,371
	Cox2-Clora	931%	1,176
	Dox-Carbo	153%	0,796
	Dox-Ciclo-Cox2	-99,39%	-2,778
Raça			
	SRD	-	-
	Boxer	21400%	2,152
	Golden Retriever	862%	1,769
	Labrador	4426%	2,301
	Pastor Alemão	NA	NA

V. Discussão

1. Influência de fatores intrínsecos ao próprio animal

1.1. Sexo

A maioria da literatura científica foca-se na incidência diferenciada do hemangiossarcoma entre os dois sexos. Estes estudos indicam uma predisposição maior dos machos para o aparecimento de hemangiossarcoma, maior ainda se estes forem castrados (Carnio et al., 2020; Robinson et al., 2020). Estes resultados diferem dos apresentados neste estudo, em que a maioria dos animais são fêmeas (56%). Assim, o rácio macho/fêmea é de 0.8 ((número de machos =17)/ (número de fêmeas =21)), bastante inferior ao apresentado noutros estudos (Yamamoto et al., 2013). Esta discrepância entre a literatura e os resultados deste estudo podem dever-se ao facto de não existir, nos dados do presente estudo, uma diferenciação entre animais castrados e animais não castrados. A esterilização de fêmeas, principalmente aquelas em que o procedimento é realizado mais tardiamente, está associado a uma maior prevalência deste tumor quando comparado a fêmeas não esterilizadas (Robinson et al., 2020).

O estrogénio irá ter um efeito protetor sobre as células, não se tornando neoplásicas, desde que a fêmea não seja esterilizada (Robinson et al., 2020). Caso contrário, após a esterilização, as células já sensibilizadas por estrogénio podem tornar-se mais facilmente neoplásicas, sendo mais fácil esta ocorrência em fêmeas que tenham sido expostas ao estrogénio durante mais tempo, ou seja, que tenham tido mais ciclos estrais (Robinson et al., 2020). Nos machos ocorre um processo semelhante, em que a perda de recetores de androgénios aumenta também a probabilidade da ocorrência da doença (Robinson et al., 2020). Neste estudo, por falta de informação na ficha clínica acerca da realização ou não de castração/esterilização dos cães, a possível existência de muitas fêmeas esterilizadas pode estar na base da diferença do rácio macho/fêmea comparativamente aos valores encontrados na literatura.

No que respeita à sobrevivência, não foram encontradas diferenças entre machos e fêmeas. Também na literatura em medicina veterinária não são encontrados estudos que abordem essa questão. Nos poucos estudos realizados em Medicina Humana (Naka et al., 1996 Morgan et al., 2004), à semelhança dos resultados deste estudo, não foram encontradas quaisquer diferenças no tempo de sobrevivência entre homens e mulheres. Contudo, um estudo recente, em medicina veterinária, revela que a expressão da histona lisina demetilase 2B (KDM2B) encontra-se mais elevada em machos do que fêmeas (Gulay et al., 2022). Apesar de ainda não haver evidência de que isto poderá estar associado a um pior prognóstico e tempo de sobrevivência em machos, sabe-se que a expressão de KDM2B foi reportado como oncogene e promotor da progressão de algumas neoplasias, tais como neoplasias pancreáticas e ováricas e que expressões elevadas estão positivamente relacionadas com um pior prognóstico, em gliomas e tumores mamários (Gulay et al., 2022). Assim, esta expressão mais elevada pode estar potencialmente relacionada com um pior tempo de sobrevivência em machos (Gulay et al., 2022). No entanto, isto não é consistente com os resultados desta dissertação. Esta diferença poderá dever-se a influência de outros fatores na sobrevivência da doença, por exemplo o protocolo quimioterapêutico, a raça e/ou tipo sanguíneo, entre outros.

1.2. Raça

Neste estudo as raças que apresentam maior número de registos de hemangiossarcoma são o Labrador (34%), Pastor Alemão (10,5%) e Golden Retriever (7,9%), concordando com o reportado na bibliografia (Tamburini et al., 2010; Batschinski et al., 2018; Mullin & Clifford, 2019; Das et al., 2021). Tamburini et al. (2010) sugerem que existem características hereditárias que incluem expressões diferentes de genes que colocam certas raças em maior risco de apresentar HSA, nomeadamente a raça Golden Retriever. Contudo, nos resultados apresentados, surgem alguns animais de raças que, segundo Davies & Taylor (2020), não seria tão expectável a presença deste tumor, nomeadamente, as raças Bulldog Francês, Boxer e Cocker Spaniel Inglês. Ainda relativo à figura 17 verifica-se uma elevada percentagem de registos classificada como animais “sem raça definida (SRD)”. Atendendo ao facto de que os animais de raça cruzada apresentam uma maior predisposição para o aparecimento de hemangiossarcoma visceral

(Carnio et al., 2020), os animais classificados, neste estudo, como SRD serão provavelmente, na sua maioria animais de raça cruzada. Estes animais, poderão ser resultado de cruzamentos com raças já elas predispostas ao aparecimento de HSA (Carnio et al., 2020), explicando o elevado número de registos.

Segundo Story et al. (2020), existe uma diferença entre a sobrevivência de raças consideradas grandes (> 20kg), daquelas consideradas raças pequenas, em que as raças de cães grandes sobrevivem menos tempo. Em parte, isto pode dever-se a uma maior probabilidade de ocorrência de hemorragia esplénica associada a hemangiossarcoma esplénico em raças grandes (Griffin et al., 2021). Isto contraria os resultados apresentados, uma vez que as duas únicas raças pequenas, Bulldog Francês e Cocker Spaniel Inglês, apresentaram tempos médios de sobrevivência bastante distintos, 418 dias e 3 dias, respetivamente. Isto pode dever-se, por exemplo, ao facto da existência de metástases no momento do diagnóstico, tendo em consideração que cerca de 80% dos animais que chegam à clínica apresentam metástases (Smith, 2003). A presença de metástases é um fator que contribui para um menor tempo de sobrevivência (Story et al., 2020), podendo isto ser uma razão explicativa da diferença da média dos tempos de sobrevivência nas raças pequenas. As restantes raças presentes neste estudo são todas raças grandes (>20 Kg) e correspondem à maioria dos casos (n= 36). As diferenças apresentadas nas raças grandes podem dever-se ao número dos animais de cada raça diagnosticado com hemangiossarcoma esplénico e ao estadio que cada animal apresenta no momento do diagnóstico (Batschinski et al., 2018). Para exemplificar, foram treze os labradores diagnosticados com HSA esplénico e o seu tempo de sobrevivência variou entre 14-1869 dias. Já a raça Leão da Rodésia apenas apresentou um indivíduo, que teve como tempo de sobrevivência 28 dias. As discrepâncias nos tempos de sobrevivência podem ainda dever-se a outros fatores influenciadores, como a realização ou não de tratamento, bem como o próprio protocolo quimioterapêutico (Batschinski et al., 2018).

1.3. Idade e Peso

Neste estudo, a maioria dos cães com hemangiossarcoma apresentava mais de 8 anos, sendo que a média foi de 9,6 anos, o que está de acordo com o reportado na bibliografia, que refere que o hemangiossarcoma visceral é mais prevalente em cães com idades superiores a 6 anos (Yamamoto et al., 2013; Carnio et al., 2020). São raros os cães com hemangiossarcoma com mais de 13 anos, podendo isto dever-se a um baixo tempo de sobrevivência dos cães que apresentam este tumor, sendo raros aqueles que ultrapassam um ano de vida após o diagnóstico (Mullin & Clifford, 2019). Neste estudo, a variável idade não foi estatisticamente significativa, semelhante ao descrito por Story et al. (2020). Contudo, segundo Kent et al. (2018), na generalidade das neoplasias caninas, uma idade superior está associada a uma maior mortalidade relacionada com cancro. Mais ainda, no caso de neoplasias vasculares, o aumento de 1 ano de idade aumenta a probabilidade de morte em 24%, contrariando os resultados deste estudo (Dahl et al., 2008). Esta diferença relativa a este estudo pode dever-se a diferentes

estádios de apresentação dos animais com HSA e/ou resposta ao tratamento realizado (Batschinski et al., 2018). De modo a poder associar a idade ao tempo de sobrevivência deveria ser realizado um estudo que padronizasse para os estádios da doença e tratamentos realizados.

A respeito dos pesos dos animais apresentados neste estudo, é possível reconhecer uma média de 30 Kg. De forma similar, Sherwood et al. (2016) demonstraram que a prevalência de HSA foi maior em cães com mais de 27,5 kg. Analisando a amostra deste estudo, verifica-se que apenas 14 dos 38 cães (cerca de 38% da amostra) apresenta um peso inferior a 27.5Kg, indo de encontro ao estudo de Sherwood et al. (2016). Apesar da maior prevalência de HSA em cães mais pesados, somente o fator peso não pode ser utilizado para o diagnóstico de HSA esplênico, quando encontradas massas ou lesões nodulares no baço (Sherwood et al., 2016). Neste estudo a sobrevivência foi afetada pelo peso, em que comparando dois cães, aquele que pesasse mais 1 kg apresentava uma probabilidade 3,35% maior de morte do que um cão que pesasse menos 1kg. Este achado não é consistente com outros estudos, que não encontraram qualquer influência do peso na sobrevivência (Carnio et al., 2020). Em parte, pode dever-se ao facto de no presente estudo a maioria dos cães ser de raças grandes (>20Kg), que como referido anteriormente, apresentam uma menor sobrevivência (Story et al., 2020). Nos dados recolhidos não se encontrava o score de condição corporal, assim, não foi possível determinar, apesar do seu peso, se os animais eram ou não obesos. A relativa importância deste aspeto deve-se ao facto de animais obesos apresentarem um risco de morte acrescido, face a animais não obesos (Salt et al., 2018). No entanto, a associação entre a obesidade e o risco de doenças neoplásicas em cães está ainda por confirmar (Chandler et al., 2017).

1.4. Tipo sanguíneo

Em medicina veterinária já foram descritos mais de 12 grupos sanguíneos em cães, a maior parte pertencentes ao sistema DEA (dog erythrocyte antigen)(Blais, 2020). O sistema mais utilizado é o DEA 1, sendo o mais importante a nível transfusacional (Tocci, 2010). Anteriormente este sistema continha diversos tipos, nomeadamente DEA 1.1, 1.2 e 1.3, que expressam antígenos funcionais à superfície dos eritrócitos, ou por outro lado, poderiam ser DEA 1 negativos, não expressando antígenos funcionais à superfície dos eritrócitos (Tocci, 2010; Polak et al., 2015; Blais, 2020). Porém, recentemente descobriu-se que os tipos 1.1, 1.2 e 1.3 não possuem um epítipo morfológicamente diferente, mas contêm sim diferentes níveis de expressão antigénica, podendo os animais ser considerados apenas como DEA 1 positivos ou DEA 1 negativos (Polak et al., 2015; Blais, 2020). Pensa-se que estes antígenos sejam formados por glicoproteínas e glicolípidos, porém, existe ainda pouca informação atualmente relativa às suas funções e propriedades (Ferreira et al., 2011; Blais, 2020). Sabendo que em humanos os tipos sanguíneos A e B estão associados a uma maior prevalência de determinadas patologias neoplásicas e que o tipo sanguíneo O não apresenta essa associação (Franchini et al., 2015), poderá ser hipotetizado que animais com grupo sanguíneo DEA 1 negativos poderão estar em menor risco de contrair certas neoplasias, nomeadamente HSA. Não obstante, os dados deste

estudo não suportam essa hipótese, podendo dever-se à ausência de registo do tipo sanguíneo para quase 50% da amostra. Até porque, um estudo realizado com 274 cães em Portugal, mostrou que a frequência de cães DEA positivos (56,4%) era ligeiramente superior aos cães DEA negativos (43,1%) (Ferreira et al., 2011), e no presente estudo, a maioria dos cães apresentavam ser DEA 1 negativos, o que demonstra que na amostra em estudo a proporção entre cães DEA 1 negativo e DEA1 positivo não é semelhante à população de cães em Portugal, o que poderá ter alguma influência nos resultados.

O efeito dos vários tipos sanguíneos na sobrevivência de pacientes com neoplasias também não se encontra reportado na literatura científica de medicina veterinária. No entanto, Franchini et al. (2015) sugerem que, em humanos, o tipo sanguíneo O está associado a uma maior sobrevivência, quando falamos de patologias neoplásicas (não especificando para o hemangiossarcoma). Os referidos autores argumentam que indivíduos dos grupos sanguíneos A e B possuem menor expressão moléculas importantes na adesão celular (fator de necrose tumoral alfa, molécula de adesão intercelular solúvel (ICAM-1), seletina-E e seletina-P), que funcionam como mediadores da inflamação crónica e recrutam células do sistema imune (Franchini et al., 2015). Na presença da molécula ICAM-1, esta molécula irá ligar-se ao endotélio, impedindo a ligação dos linfócitos a este (Franchini et al., 2015). As células neoplásicas utilizam mecanismos semelhantes para se ligarem ao endotélio e metastizarem, sendo isto beneficiado aquando da ausência da molécula ICAM-1 (Franchini et al., 2015). Assim, os grupos sanguíneos A e B, possuindo menor expressão da molécula mencionada anteriormente, estão em maior risco de mortalidade, existindo assim maior potencialização da metastização (Franchini et al., 2015). Os dados deste estudo suportam estes argumentos, uma vez que existiu uma diferença significativa entre os tipos sanguíneos DEA 1 positivo e DEA 1 negativo, em que o tempo de sobrevivência foi superior em cães com tipo sanguíneo DEA 1 negativo.

2. Influência das apresentações clínicas

2.1. Hemoabdómen

Schick et al. (2019) detetaram que cerca de 70% dos cães no seu estudo apresentavam o hemangiossarcoma como causa de hemoabdómen. Os dados reportados por Mullin & Clifford (2020) suportam estes de Schick et al. (2019) onde se reporta que esta variação, do número de animais que apresentam hemoabdómen provocado por hemangiossarcoma, pode oscilar entre 63-70%. Já nos dados deste estudo, a maioria dos cães com hemangiossarcoma esplénico apresentavam hemoabdómen (n=28; 73.7%). A grande parte dos animais com HSA são apresentados em clínica ou com sinais não específicos (anorexia, letargia), ou em situações agudas graves (choque hipovolémico, efusão abdominal, entre outras) (Lang, 2020), sendo que mais do que qualquer outro tipo de tumor, o hemangiossarcoma esplénico tem maior probabilidade de ruturar e provocar hemoabdómen (Cleveland & Casale, 2016). Pode acontecer que alguns tutores de animais, com sinais clínicos mais ligeiros, não demonstrem iniciativa de

levar os seus animais a serem diagnosticados, fazendo com que a maioria chegue à clínica apresentando uma situação mais aguda da doença, podendo apresentar como sinal clínico frequente o hemoabdómen.

Relativamente à influência de efusão abdominal na sobrevivência, neste estudo não foram encontradas quaisquer evidências de uma associação entre a presença/ausência de hemoabdómen e tempo de sobrevivência dos animais. Os resultados são consistentes com outros estudos, em que quando avaliado individualmente, o hemoabdómen, não influencia a sobrevivência em cães (Masyr et al., 2021). A ausência de diferenças pode dever-se à ocorrência de deteção e tratamento (esplenectomia no caso deste estudo) precoce, favorecendo a sobrevivência pós-cirúrgica destes animais com hemoperitoneu (Cleveland & Casale, 2016).

2.2. Hemograma

No presente estudo, dos animais com registo da contagem de leucócitos a maioria apresenta leucocitose no momento do diagnóstico (n=16), no entanto, o número de animais com contagem de leucócitos normal não é muito diferente (n=15), podendo isto dever-se à quantidade de animais que não apresentam registo desta informação (cerca de 18% da amostra). Também no estudo de Masyr et al. (2021) foi detetado uma proximidade do número de animais com e sem leucocitose (46% apresentavam leucocitose). Ainda, comparando os resultados obtidos relativamente aos leucócitos, verifica-se que as alterações neste parâmetro não se devem a um aumento de linfócitos ou monócitos, uma vez que na maioria dos animais, encontram-se dentro dos valores de referência. Assim, esta leucocitose pode dever-se a uma neutrofilia, que é um achado laboratorial comum em animais com HSA (Yamamoto et al., 2013; Wong et al., 2015). Ainda, segundo Masyr et al. (2021), a maioria dos animais apresentaram trombocitopénia (71%), o que difere deste estudo, cuja percentagem de animais com trombocitopénia é de 42,1%, podendo isto dever-se também aos animais que não apresentavam registo (18,4%). Os resultados da contagem plaquetária devem ser interpretados com cuidado, devido à possibilidade de ocorrência de pseudo-trombocitopénia decorrente de coagulação da amostra (Wong et al., 2015; Masyr et al., 2021). O facto de alguns animais poderem apresentar coagulação intravascular disseminada (CID) pode, devido a consumo plaquetário, acentuar ainda mais a trombocitopénia nestes animais (Ng & Mills, 1985; Wong et al., 2015), visto que a ocorrência de CID está presente em mais de 50% dos animais com HSA (Wong et al., 2015). Observando as alterações do eritrograma, nomeadamente, número de eritrócitos, hematócrito e valores de hemoglobina, estes encontram-se baixos em 55,3%, 44,7% e 63,2% dos animais, respetivamente. Os animais que têm estes valores diminuídos são, portanto, em maior número do que aqueles que têm estes valores dentro dos parâmetros normais. Masyr et al. (2021) também encontraram valores inferiores de hematócrito em 74% dos animais. As potenciais razões para este acontecimento podem dever-se à presença de anemia da doença crónica e/ou hemólise microangiopática (Wong et al., 2015). Os presentes resultados apresentam valores mais baixos comparativamente aos reportados por Masyr et al. (2021), em parte devido à falta

de recolha de dados de cerca de 18% dos animais, como referido igualmente nos restantes parâmetros. Os valores baixos dos parâmetros relativos ao eritrograma, sugerem que, pelo menos parte destes animais estão anémicos, podendo estas anemias ser tanto de características regenerativas ou não-regenerativas (Mullin & Clifford, 2019). Todos os achados hematológicos acima descritos, encontram-se bem representados na bibliografia (Wong et al., 2015; Mullin & Clifford, 2019), no entanto, é de notar que para além dos parâmetros avaliados, é comum, em cães com HSA, a presença esquisócitos e acantócitos nos esfregaços sanguíneos (Wong et al., 2015; Mullin & Clifford, 2019). Por fim, estes dados permitem corroborar com os atuais conhecimentos dos parâmetros hematológicos, em que, a anemia, a trombocitopénia e a leucocitose são achados comuns no hemograma deste tipo de pacientes oncológicos (Wong et al., 2015; Masyr et al., 2021; Mullin & Clifford, 2019).

No estudo apresentado não houve qualquer diferença significativa relativamente à influência dos parâmetros do hemograma analisados (hematócrito, valores de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total de leucócitos, contagem de linfócitos e contagem de plaquetas) quanto ao tempo de sobrevivência de animais com hemangiossarcoma esplénico. Um estudo reporta que a presença de anemia pré-operatória afeta de forma negativa a atuação de alguns quimioterápicos, nomeadamente, a doxorrubicina (Primeau et al., 2005). A anemia poderá servir como marcador de hipóxia tumoral e conseqüentemente poderá servir, em parte, como mecanismo de resistência à quimioterapia, neste caso com doxorrubicina (Primeau et al., 2005). Em tumores sólidos, as células presentes nestas zonas de hipóxia, apresentam menor aporte sanguíneo, estando protegidas da ação dos fármacos quimioterápicos, pois estes não conseguem chegar a esses locais através da circulação (Primeau et al., 2005). Contudo, neste estudo, apenas cinco animais realizaram tratamento com doxorrubicina isoladamente. Assim, a associação de outros fármacos poderá limitar o mecanismo de quimioresistência da anemia. Adicionalmente, o efeito da anemia apenas se torna significativo quando considerado o estadió tumoral (Masyr et al., 2021), que neste estudo não foi registado. No que refere à trombocitopénia, um menor tempo de sobrevivência poderá estar associado a distúrbios hemostáticos, sendo estes comuns em animais com hemangiossarcoma (Masyr et al., 2021). Mais ainda, o tempo de sobrevivência em animais com trombocitopénia vai piorando à medida que consideramos outros fatores, nomeadamente, o estadió tumoral, idade e presença/ ausência de anemia. Não houve, no entanto, registo dos parâmetros que permitissem afirmar se houve ou não alterações da hemostase, nem registo de parâmetros que permitissem realizar uma análise multivariada, para identificar uma ação conjunta com a trombocitopénia, particularmente, o estadió tumoral. Para finalizar, a falta de associação entre leucocitose e o tempo de sobrevivência estão de acordo ao encontrado na bibliografia, em que, quando considerado como parâmetro individual ou em conjunto com outras variáveis, não apresentou qualquer influência quanto ao tempo de sobrevivência de cães com hemangiossarcoma (Masyr et al., 2021).

3. Influência da terapêutica

3.1. Transfusão

A maioria dos cães diagnosticados com massas esplênicas, que necessitam de transfusões sanguíneas, apresentam hemangiossarcoma (Lynch et al., 2015). Isto é consistente com os resultados deste estudo, que demonstram que a maioria dos cães com HSA realizaram transfusões sanguíneas (cerca de 58% da amostra). O grande número de transfusões em cães com este tumor pode dever-se ao facto de que o HSA, mais do que qualquer outro tumor, pode roturar e provocar hemoabdómen e sendo este um tumor vascular, irá existir grande perda sanguínea (Cleveland & Casale, 2016). A terapêutica de animais hemodinamicamente instáveis, apresentando sinais de choque e anemia, é uma das principais razões para recorrer a transfusões sanguíneas (Lynch et al., 2015). Outro importante fator que potencia o uso de transfusões, nomeadamente de plasma fresco congelado, poderá ser que à admissão do animal no hospital, estes muitas vezes encontram-se com valores de contagem plaquetária bastante baixos (Hammond & Pesillo-Crosby, 2008).

Observando a figura 23 e a tabela 9, conclui-se que não existem diferenças no tempo de sobrevivência dos animais que receberam ou não transfusões. Resultados semelhantes foram relatados por Masyr et al. (2021), em que, quando considerado como fator individual e em conjunto com outras variáveis, a realização ou não de transfusão não apresentou diferenças no tempo de sobrevivência dos animais do estudo com hemangiossarcoma. Da mesma forma, Marconato et al. (2019) não identificaram influência da transfusão sanguínea na sobrevivência de animais com HSA esplênico. No entanto, não existe consenso no que toca à sobrevivência relacionada com a administração de transfusões em cães, havendo estudos que indicam o contrário do anteriormente mencionado, como é o caso de Lynch et al. (2015), onde os autores referem que cães que receberam transfusão têm menores tempos de sobrevivência. Devido ao carácter subjetivo da decisão médico-veterinária de realização ou não de transfusão, bem como da quantidade transfundida destes produtos, a sua consideração como fator prognóstico de sobrevivência é questionável (Wendelburg et al., 2014).

3.2. Quimioterapia

Pela análise de dados deste estudo verifica-se que grande parte dos animais não realizou nenhum protocolo quimioterapêutico (47,4%) (figura 15). Estes animais apenas realizaram esplenectomia. No tratamento do HSA, a cirurgia continua a ser a principal base terapêutica. (Mullin & Clifford, 2020). Não pode ser ignorado o facto de alguns destes animais, categorizados como não tendo feito qualquer protocolo quimioterapêutico, podem na verdade ter realizado quimioterapia, sem que esta tenha sido registada no sistema, uma vez que, na maioria dos casos, é realizada quimioterapia adjuvante após a excisão cirúrgica, devido à elevada capacidade de metastização por parte deste tumor (Batschinski et al., 2018; Mullin & Clifford, 2020). Analisando apenas os animais que realizaram protocolos de quimioterapia, verifica-se

que, cerca de metade realizou quimioterapia adjuvante incluindo doxorrubicina (50%). Encontram-se valores semelhantes na bibliografia, em que a maioria dos protocolos experimentais inclui doxorrubicina (Mullin & Clifford, 2020). Contudo, neste estudo, a doxorrubicina individualmente apenas foi utilizada em cinco casos, podendo isto dever-se à elevada quantidade de efeitos secundários associadas à mesma, nomeadamente, cardiotoxicidade, anemia, leucopénia, entre outros (Manno et al., 2016; Faulhaber et al., 2021). Assim, apesar do maior tempo de sobrevivência associado à utilização de doxorrubicina, a maior toxicidade nos animais que utilizaram este fármaco como protocolo convencional, levou a uma pior qualidade de vida destes, pondo em questão se este deve ser utilizado (Marconato et al., 2019). O protocolo quimioterapêutico mais utilizado neste estudo foi a combinação de ciclofosfamida com um anti-inflamatório inibidor da Cox-2 (AINES-COX2). Esta combinação de fármacos, muitas vezes utilizada de forma metronómica (Finotello et al., 2017), resulta em efeitos secundários menos graves do que aqueles provocados pela doxorrubicina (Matsuyama et al., 2017; Gustafson & Bailey, 2020). Os animais que realizaram quimioterapia apenas com ciclofosfamida (n=1) e clorambucil (n=1), podem, na verdade, também ter utilizado um AINES-COX2 e a sua utilização não ter sido registada.

Não ocorreram diferenças significativas na análise de sobrevivência, entre os vários protocolos de quimioterapia realizados neste estudo, no modelo que incluía os animais que apenas realizaram esplenectomia (“nenhum”) (tabela 10; figura 24). Isto reflete o referido no parágrafo anterior, em que provavelmente, alguns destes animais terão realizado um protocolo de quimioterapia e este não terá sido inserido no sistema pelo clínico responsável, levando à ausência de diferenças significativas neste estudo. Daí ter-se construído um novo modelo (tabela 11; figura 25), em que, os diversos protocolos quimioterapêuticos são comparados com o protocolo mais utilizado na bibliografia (doxorrubicina de forma isolada). Neste novo modelo, verifica-se que existem diferenças na sobrevivência entre a utilização de doxorrubicina isoladamente e a utilização do protocolo com ciclofosfamida e AINES-COX2, bem como, entre a utilização de doxorrubicina isoladamente e o protocolo com doxorrubicina, ciclofosfamida e AINES-COX2 (tabela 11). Para qualquer um dos protocolos acima referidos, quando comparados à utilização de doxorrubicina isoladamente, houve uma melhoria no tempo de sobrevivência, sendo esta maior para a utilização do protocolo com doxorrubicina, ciclofosfamida e AINES-COX2 (Hazard Ratio= -92,98%). Foi demonstrado que a utilização de doxorrubicina seguida da aplicação metronómica de ciclofosfamida não apresenta diferenças quando comparado à utilização isolada de doxorrubicina, no que diz respeito ao tempo de sobrevivência (Matsuyama et al., 2017), porém, dos animais que realizaram esta terapia metronómica, nem todos utilizaram AINES (anti-inflamatórios não esteróides). Pelo contrário, no estudo de Finotello et al. (2017) obtiveram-se resultados que indicam que os cães que receberam quimioterapia convencional com doxorrubicina seguida de quimioterapia metronómica, baseada em ciclofosfamida com AINES, obtiveram tempos de vida mais prolongados do que aqueles que receberam

quimioterapia apenas com doxorrubicina, consistente com os dados apresentados nesta dissertação. Em certos tumores foi descoberto que as células tumorais expressam COX-2 em grandes quantidades, produzindo prostaglandina E2, que aparenta promover a tumorigênese (Elmslie et al., 2008; Kahn et al., 2013). Os AINES inibem as ciclooxigenases (COX), enzimas responsáveis pela conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos, sendo uma das razões para o uso de AINES em conjunto com a quimioterapia metronômica (Kahn et al., 2013). Porém, apesar do hemangiossarcoma não apresentar sobre-expressão de COX-2, já foi demonstrado a sua eficácia a nível clínico (Kahn et al., 2013). Em tumores que não apresentem essa característica, o uso de AINES em conjunto com a quimioterapia metronômica irá contrapor-se à angiogênese tumoral, tendo um efeito sinérgico na ação da ciclofosfamida quando usados em conjunto (Finotello et al., 2017). Assim, a utilização de ciclofosfamida em conjunto com AINES-COX2 promove um aumento da sobrevivência, em cães com HSA, independentemente da utilização ou não de doxorrubicina. No que respeita a utilização de carboplatina, de forma semelhante a esta dissertação, foi observado tempos de sobrevivência semelhantes quando comparada com a doxorrubicina (Faulhaber et al., 2021). Já no único estudo encontrado onde utilizaram clorambucil, o cão apresentou um tempo de sobrevivência prolongado (Chaikin & Welihozkiy, 2018), contrariado as observações deste estudo. Não obstante, os dados de (Chaikin & Welihozkiy, 2018) devem ser interpretados com cautela uma vez que o estudo foi realizado apenas com um animal.

4. Influência conjunta da raça, peso e quimioterapia

Ao contemplar os estudos presentes na literatura, que englobam análises multivariadas, verifica-se que apenas alguns incidem sobre os fatores que influenciam a sobrevivência em cães com hemangiossarcoma. Ao analisar, com uma análise multivariada, hemangiossarcomas subcutâneos e intramusculares, Shiu et al. (2011) identificaram os seguintes fatores como influenciadores da sobrevivência: presença/ausência de metástases, tumores com tamanho inferior a quatro centímetros, receção completa ou incompleta do tumor e presença macroscópica do tumor primário. Por outro lado, alguns estudos, estes envolvendo hemangiossarcoma esplênico, apenas identificam uma variável que afeta a sobrevivência. É o caso de Moore et al. (2017), que apenas identificam na sua análise multivariada, o índice mitótico como preditor da sobrevivência em cães com hemangiossarcoma esplênico, sobrevivendo mais tempo aqueles com o índice mitótico mais baixo. Nesta dissertação, optou-se por realizar uma análise multivariada apenas com as variáveis que demonstraram ser significativas na análise univariada, à semelhança do realizado noutros estudos (Ex.:Marconato et al., 2019). No entanto, teve de ser retirada a variável “tipo de sangue”, uma vez que o número reduzido de animais com o sangue tipificado não permitia a realização da análise de sobrevivência multivariada. Uma das conclusões que podem ser retiradas da análise multivariada deste estudo é que, tendo em consideração a terapêutica e a raça, o peso deixa de ter influência sobre a sobrevivência dos animais. Isto não é concordante com os resultados apresentados por Carnio et al. (2020) para

hemangiossarcoma visceral, no entanto, os autores deste estudo, apenas avaliam fatores intrínsecos (idade, sexo, estatuto reprodutor, tamanho e raça) e não consideram a influência de outros fatores, por exemplo, protocolo de quimioterapia e a presença de metástases, já citados por outros autores, como sendo fatores que influenciam a sobrevivência de animais com HSA esplênico (Story et al., 2020). Por outro lado, os resultados desta dissertação evidenciam que a raça labrador apresenta, quando considerado o peso e o protocolo quimioterapêutico, um menor tempo de sobrevivência, consistente com o facto das raças maiores apresentarem um menor tempo de sobrevivência (Story et al., 2020). A presença de diferenças significativas para a raça labrador, poderá dever-se a dois fatores: (1) Uma maior prevalência de obesidade em cães labradores (Meena et al., 2022), que por sua vez está associada a uma menor qualidade de vida e tempo de sobrevivência (Salt et al., 2018) e/ou (2) uma sobre representação da raça labrador, neste estudo, face às outras raças. Quando retirados os cães sem raça definida, os labradores perfazem 48% da amostra. O reduzido tempo de sobrevivência dos dois cães de raça boxer neste estudo pode dever-se à presença e número de metástases e/ou estadio clínico do tumor (parâmetros não avaliados neste estudo), que, como demonstrado anteriormente, são fatores que influenciam o tempo de sobrevivência (Batschinski et al., 2018; Story et al., 2020).

O resultado da análise multivariada deste estudo permite inferir que, quando considerada a influência do peso e da raça, existem diferenças no tempo de sobrevivência dos diversos protocolos quimioterapêuticos. A administração de ciclofosfamida em conjunto com AINES-COX2 e a administração de doxorrubicina, ciclofosfamida e AINES-COX2 demonstraram ter um efeito positivo no tempo de sobrevivência dos animais, o que é concordante com os resultados da análise univariada apresentada, em que para estes mesmos tratamentos, foram obtidos tempos de sobrevivência superiores, comparativamente com a administração de doxorrubicina isolada. Já a administração de ciclofosfamida isoladamente obteve piores tempos de sobrevivência comparativamente à doxorrubicina. Estudos encontraram resultados semelhantes, em que a aplicação de uma quimioterapia baseada em ciclofosfamida em doses metronómicas resultou em menores tempos de sobrevivência do que a utilização do protocolo em máximas doses com doxorrubicina (Marconato et al., 2019). Assim, tendo em conta que a ciclofosfamida é utilizada maioritariamente em doses metronómicas, estes resultados sugerem que a terapêutica ideal incorpora doxorrubicina em doses convencionais (30 mg/m²) e ciclofosfamida em doses metronómicas (10 -15 mg/m²) em conjunto com AINES-COX2.

5. Limitações

A principal limitação deste estudo é a existência de registos incompletos por parte dos clínicos no sistema utilizado no hospital. A existência de fichas clínicas com informação incompleta levou a que muitas das análises univariadas tivessem uma amostra muito reduzida de animais, por exemplo, no caso do tipo sanguíneo, apenas 20 animais de um total de 38 tinham esta tipificação registada, o que reduziu a fiabilidade da análise estatística. Adicionalmente, a ausência acentuada de alguns dos parâmetros (p.e.: índice mitótico, estadio tumoral, tamanho

da neoplasia) não permitiu a sua inclusão nesta análise. Alguns destes parâmetros foram demonstrados na bibliografia, como tendo bastante relevância nos tempos de sobrevivência de cães com HSA esplênico (Moore et al., 2017; Batschinski et al., 2018; Story et al., 2020). Pode ainda ter ocorrido casos, em que o hemograma registado nesta análise, não ter sido o primeiro hemograma realizado ao animal, mas sim o hemograma mais cedo relatado pelo clínico na base de dados. Isto poderá ter particular efeito na análise, que relaciona as análises clínicas com a sobrevivência, desde a data registada, como sendo diagnóstica de hemangiossarcoma esplênico.

Mesmo tendo em consideração os parâmetros com maior número de registos completos, existem alguns fatores que podem influenciar os resultados estatísticos. O primeiro destes fatores é a possibilidade de a morte do animal ser devido a causas externas ao hemangiossarcoma, por exemplo, eutanásia por estado avançado da doença. Mais ainda, os animais cujo “estado” se apresentava como morto, pode na verdade ter sido a última consulta em que compareceram no hospital, não querendo isto dizer que tenham morrido naquele dia, podendo resultar no enviesamento dos resultados. Um segundo fator que pode influenciar a análise é a data do diagnóstico. Alguns dos cães começaram a ser seguidos pelo hospital após terem sido encaminhados para uma consulta de segunda opinião, assim, nestes animais, a data do diagnóstico é a data da consulta de segunda opinião, podendo não corresponder à data do primeiro diagnóstico. De referir ainda que a data de diagnóstico pode ser bastante variável, uma vez que depende da prontidão com que os tutores levam os animais ao hospital para observação. Um outro fator limitante deste trabalho, é o facto de no caso das incidências de hemangiossarcoma esplênico, estas não foram comparadas com uma população controlo, sem manifestação da doença. Isto apenas permite detetar a maior frequência de uma dada característica numa população de cães com hemangiossarcoma, não permitindo identificar se existe uma relação entre essa característica, na população geral de cães, e a incidência do hemangiossarcoma.

Concluindo, no que diz respeito à terapêutica, apesar de registados os fármacos utilizados, eram poucos aqueles que permitiam recolher as dosagens administradas, bem como o número de ciclos de quimioterapia realizados, que como demonstrado em Marconato et al. (2019) podem ter influência no tempo de sobrevivência destes animais. Adicionalmente, não foi discriminado, no registo dos animais, qual o anti-inflamatório não esteróide inibidor da cicloxigenase 2 utilizado, podendo ter sido utilizado sempre o mesmo para todos os animais, o que não afeta os resultados, ou por outro lado, ter sido utilizado um conjunto de AINES-Cox2 diferente, que poderá resultar numa diversificação dos tempos de sobrevivência.

VI. Conclusão

O hemangiossarcoma é um dos tumores mais agressivos em cães, cujo prognóstico de sobrevivência, em geral, é mau (Mullin & Clifford, 2020). A cirurgia é tomada como a melhor abordagem terapêutica em animais com esta neoplasia, porém, na maioria das vezes não é mais que uma abordagem paliativa (Mullin & Clifford, 2020). A doxorrubicina continua a ser o fármaco quimioterapêutico mais utilizado e apesar do aumento no tempo médio de sobrevivência observado, os benefícios, em geral, são mínimos (Mullin & Clifford, 2020). Novas abordagens usando novas técnicas cirúrgicas, quimioterapia convencional, quimioterapia metronômica, terapia anti-angiogênica e imunoterapia estão a ser estudadas, porém, mais estudos são necessários neste âmbito para que se consiga alterar realmente o prognóstico deste tumor (Mullin & Clifford, 2020).

Nesta dissertação foram avaliados quais os possíveis fatores que influenciam a sobrevivência de cães com hemangiossarcoma esplênico e que realizaram esplenectomia. É possível concluir, que dos fatores intrínsecos ao próprio animal apenas a raça, peso e tipo sanguíneo, individualmente, influenciam a sobrevivência dos animais com HSA esplênico. A predisposição genética da raça foi confirmada neste estudo, tendo as raças de grande porte um menor tempo de sobrevivência comparativamente às raças de pequeno porte. Esta tendência é também confirmada na análise relativa ao peso, em que animais mais pesados apresentaram tempos de sobrevivência menores. A relação do peso com a sobrevivência pode dever-se ao facto de animais com scores de condição corporal mais elevados sobreviverem menos tempo, no entanto, esta relação não pode ser confirmada devido à ausência de informação da variável score de condição corporal. Quanto à variável tipo sanguíneo, animais com tipo sanguíneo DEA 1 negativos sobreviveram mais tempo, que poderá dever-se à ausência de moléculas de adesão em animais DEA 1 positivos, à semelhança do que acontece em humanos com os tipos sanguíneos A e B, que vai facilitar a metastização do hemangiossarcoma, contudo, este mecanismo ainda está por confirmar em animais de companhia. A outra variável, que individualmente demonstrou ser significativa, foi a quimioterapia. Neste caso, o tratamento com ciclo-cox2 e dox-ciclo-cox2 resultou em tempos de sobrevivência superiores, quando comparados aos tratamentos realizados apenas com doxorrubicina. Esta diferença pode dever-se à administração de AINES-Cox2, que poderá apresentar efeito sinérgico à administração do restante protocolo quimioterapêutico com ciclofosfamida.

Já na análise multivariada conclui-se que, quando considerados a raça e o tratamento quimioterapêutico, o peso do animal deixa de ter importância na determinação do tempo de sobrevivência. Significa isto que, as raças geneticamente predispostas e os tratamentos que utilizam ciclofosfamida em conjunto com um AINES-Cox2, são os principais fatores que contribuem para as variações do tempo de sobrevivência em cães com hemangiossarcoma esplênico.

Não foi possível verificar, neste estudo, alguns resultados descritos na bibliografia, no que concerne à sobrevivência de cães com HSA esplênico, podendo isto ser atribuídos à ausência de registos neste estudo, que comprometem a análise estatística, bem como as conclusões passíveis de serem retiradas.

VII. Bibliografia

- Abou Asa, S., Mori, T., Maruo, K., Khater, A., El-sawak, A., Abd el-Aziz, E., Yanai, T., & Sakai, H. (2015). Analysis of genomic mutation and immunohistochemistry of platelet-derived growth factor receptors in canine vascular tumours: Analysis of PDGFR mutations in canine vascular tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, *13*(3), 237–245. <https://doi.org/10.1111/vco.12035>
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, *30*(16), R921–R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
- Arai, S., Milley, E. P., Lichtenberger, J., Savidge, C., Lawrence, J., & Côté, E. (2019). Metastatic Cardiac Hemangiosarcoma in a 6 Year Old Wheaten Terrier Mix. *Veterinary Sciences*, *6*(3), 65. <https://doi.org/10.3390/vetsci6030065>
- Batschinski, K., Nobre, A., Vargas-Mendez, E., Tedardi, M. V., Cirillo, J., Cestari, G., Ubukata, R., & Dagli, M. L. Z. (2018). *Canine visceral hemangiosarcoma treated with surgery alone or surgery and doxorubicin: 37 cases (2005–2014)*. *59*, 957–972.
- Bertazzolo, W., Dell’Orco, M., Bonfanti, U., Ghisleni, G., Caniatti, M., Masserdotti, C., Antoniazzi, E., Crippa, L., & Roccabianca, P. (2005). Canine angiosarcoma: Cytologic, histologic, and immunohistochemical correlations. *Veterinary Clinical Pathology*, *34*(1), 28–34. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00005.x>
- Billir, B. (2014). Metronomic Chemotherapy in Veterinary Patients with Cancer. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *44*(5), 817–829. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.05.003>
- Blais, M.-C. (2020). *Updates in Canine Blood Types and Pretransfusion Compatibility Testing*. International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium 2020, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, QC, Canada.

- Brown, D. C., & Reetz, J. (2012). Single Agent Polysaccharopeptide Delays Metastases and Improves Survival in Naturally Occurring Hemangiosarcoma. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1–8.
<https://doi.org/10.1155/2012/384301>
- Carnio, A., Eleni, C., Cocumelli, C., Bartolomé Del Pino, L. E., Simeoni, S., Spallucci, V., & Scaramozzino, P. (2020). Evaluation of intrinsic and extrinsic risk factors for dog visceral hemangiosarcoma: A retrospective case-control study register-based in Lazio region, Italy. *Preventive Veterinary Medicine*, 181, 105074.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105074>
- Case, J. B., Maxwell, M., Aman, A., & Monnet, E. L. (2013). Outcome evaluation of a thoracoscopic pericardial window procedure or subtotal pericardectomy via thoracotomy for the treatment of pericardial effusion in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242(4), 493–498.
<https://doi.org/10.2460/javma.242.4.493>
- Chaikin, P., & Welihozkiy, A. (2018). Hemangiosarcoma in a Dog: Unusual Presentation and Increased Survival Using a Complementary/Holistic Approach Combined with Metronomic Chemotherapy. *Case Reports in Veterinary Medicine*, 2018, 1–6.
<https://doi.org/10.1155/2018/6160980>
- Chandler, M., Cunningham, S., Lund, E. M., Khanna, C., Naramore, R., Patel, A., & Day, M. J. (2017). Obesity and Associated Comorbidities in People and Companion Animals: A One Health Perspective. *Journal of Comparative Pathology*, 156(4), 296–309.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.03.006>
- Childress, M. (2012). Hematologic Abnormalities in the Small Animal Cancer Patient. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 42(1), 123–155.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.09.009>

- Chun, R., Kelliham, H. B., Henik, R. A., & Stepien, R. L. (2010). Comparison of plasma cardiac troponin I concentrations among dogs with cardiac hemangiosarcoma, noncardiac hemangiosarcoma, other neoplasms, and pericardial effusion of nonhemangiosarcoma origin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *237*(7), 806–811. <https://doi.org/10.2460/javma.237.7.806>
- Cleveland, M. J., & Casale, S. (2016). Incidence of malignancy and outcomes for dogs undergoing splenectomy for incidentally detected nonruptured splenic nodules or masses: 105 cases (2009–2013). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *248*(11), 1267–1273. <https://doi.org/10.2460/javma.248.11.1267>
- Clifford, C. A., Hughes, D., Beal, M. W., Mackin, A. J., Henry, C. J., Shofer, F. S., & Sorenmo, K. U. (2000). *Plasma Vascular Endothelial Growth Factor Concentrations in Healthy Dogs and Dogs with Hemangiosarcoma*. 5.
- Clifford, C. A., Mackin, A. J., & Henry, C. J. (2000). *Treatment of Canine Hemangiosarcoma: 2000 and Beyond*. *14*, 479–485.
- Coffee, C., Roush, J. K., & Higginbotham, M. L. (2020). Carboplatin-induced myelosuppression as related to body weight in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, *18*(4), 804–810. <https://doi.org/10.1111/vco.12622>
- Dahl, K., Gamlem, H., Tverdal, A., Glattre, E., & Moe, L. (2008). Canine vascular neoplasia—A population-based study of prognosis. *APMIS*, *116*, 55–62. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.125m5.x>
- Das, D., Manikanta, K., Kumthekar, S., Achary, K. H., & Deshkar, M. M. (2021). Hemangiosarcoma in German shepherd dog. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, *9*(1), 331–333. <https://doi.org/10.22271/j.ento.2021.v9.i1e.8165>
- Davies, O., & Taylor, A. J. (2020). Refining the “double two-thirds” rule: Genotype-based breed grouping and clinical presentation help predict the diagnosis of canine splenic mass

- lesions in 288 dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 18(4), 548–558.
<https://doi.org/10.1111/vco.12574>
- Dickerson, E. B., Thomas, R., Fosmire, S. P., Lamerato-Kozicki, A. R., Bianco, S. R., Wojcieszyn, J. W., Breen, M., Helfand, S. C., & Modiano, J. F. (2005). Mutations of Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 in Canine Hemangiosarcoma. *Veterinary Pathology*, 42(5), 618–632. <https://doi.org/10.1354/vp.42-5-618>
- Dos Anjos, D. S., Assis, A. R., Fonseca-Alves, C. E., & Babo-Terra, V. J. (2016). Clinical, Pathological and Immunohistochemical Evaluation of a Primary Hemangiosarcoma in a Pinscher Dog. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44(1), 6. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.84538>
- Elmslie, R. E., Glawe, P., & Dow, S. W. (2008). Metronomic Therapy with Cyclophosphamide and Piroxicam Effectively Delays Tumor Recurrence in Dogs with Incompletely Resected Soft Tissue Sarcomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(6), 1373–1379. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0179.x>
- Fabbi, M., Di Palma, S., Manfredi, S., Gnudi, G., Miduri, F., Daga, E., Melis, G. C., Bianchi, E., Voccia, S., & Volta, A. (2017). Imaging diagnosis-ultrasonographic appearance of skeletal muscle metastases in a dog with hemangiosarcoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 58(6), E64–E67. <https://doi.org/10.1111/vru.12432>
- Fan, T. M. (2021). *Outcomes of Dogs with Splenic Mass Rupture*. Clinicians Brief.
<https://www.cliniciansbrief.com/article/outcomes-dogs-splenic-mass-rupture>
- Faulhaber, E. A., Janik, E., & Thamm, D. H. (2021). Adjuvant carboplatin for treatment of splenic hemangiosarcoma in dogs: Retrospective evaluation of 18 cases (2011-2016) and comparison with doxorubicin-based chemotherapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(4), 1929–1934. <https://doi.org/10.1111/jvim.16212>

- Ferraro, F., Celso, C. L., & Scadden, D. (2010). Adult Stem Cells and Their Niches. *The Cell Biology of Stem Cells*, 695, 155–168. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7037-4_11
- Ferreira, R. R. F., Gopegui, R. R., & Matos, A. J. F. (2011). Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal: Frequency of DEA 1.1 in Portuguese dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(2), 198–201. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00311.x>
- Finotello, R., Henriques, J., Sabattini, S., Stefanello, D., Felisberto, R., Pizzoni, S., Ferrari, R., & Marconato, L. (2017). A retrospective analysis of chemotherapy switch suggests improved outcome in surgically removed, biologically aggressive canine haemangiosarcoma: Chemotherapy switch in aggressive haemangiosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(2), 493–503. <https://doi.org/10.1111/vco.12193>
- Fosmire, S. P., Dickerson, E. B., Scott, A. M., Bianco, S. R., Pettengill, M. J., Meylemans, H., Padilla, M., Frazer-Abel, A. A., Akhtar, N., Getzy, D. M., Wojcieszyn, J., Breen, M., Helfand, S. C., & Modiano, J. F. (2004). Canine malignant hemangiosarcoma as a model of primitive angiogenic endothelium. *Laboratory Investigation*, 84(5), 562–572. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700080>
- Franchini, M., Liunbruno, G. M., Lippi, G., & Scatena, F. (2015). The prognostic value of ABO blood group in cancer patients. *Blood Transfusion*. <https://doi.org/10.2450/2015.0164-15>
- Gorden, B. H., Kim, J.-H., Sarver, A. L., Frantz, A. M., Breen, M., Lindblad-Toh, K., O'Brien, T. D., Sharkey, L. C., Modiano, J. F., & Dickerson, E. B. (2014). Identification of Three Molecular and Functional Subtypes in Canine Hemangiosarcoma through Gene Expression Profiling and Progenitor Cell Characterization. *The American Journal of Pathology*, 184(4), 985–995. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.12.025>

- Göritz, M., Müller, K., Krastel, D., Staudacher, G., Schmidt, P., Kühn, M., Nickel, R., & Schoon, H.-A. (2013). Canine Splenic Haemangiosarcoma: Influence of Metastases, Chemotherapy and Growth Pattern on Post-splenectomy Survival and Expression of Angiogenic Factors. *Journal of Comparative Pathology*, *149*(1), 30–39.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.11.234>
- Griffin, M. A., Culp, W. T. N., & Rebhun, R. B. (2021). Canine and feline haemangiosarcoma. *Veterinary Record*, *189*(9). <https://doi.org/10.1002/vetr.585>
- Gulay, K. C. M., Aoshima, K., Kim, S., Kitaguchi, R., Kobayashi, A., & Kimura, T. (2022). The expression of histone lysine demethylase 2B in canine hemangiosarcoma is associated with disease progression. *Veterinary and Comparative Oncology*, *20*(2), 529–534.
<https://doi.org/10.1111/vco.12796>
- Gustafson, D., & Bailey, D. (2020). Cancer Chemotherapy. Em *Withrow and Macewen's Small Animal Clinical Oncology* (6.^a ed.). Elsevier.
- Hammond, T. N., & Pesillo-Crosby, S. A. (2008). Prevalence of hemangiosarcoma in anemic dogs with a splenic mass and hemoperitoneum requiring a transfusion: 71 cases (2003–2005). *Scientific Reports*, *232*(4), 6.
- Helfand, S. C. (1988). Platelets and Neoplasia. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *18*(1), 131–156. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(88\)50013-X](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(88)50013-X)
- Herold, L. V., Devey, J. J., Kirby, R., & Rudloff, E. (2008). Clinical evaluation and management of hemoperitoneum in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, *18*(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2007.00265.x>
- Hristov, M., & Weber, C. (2004). Endothelial progenitor cells: Characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *8*(4), 498–508. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00474.x>

- Kahn, S. A., Mullin, C. M., de Lorimier, L.-P., Burgess, K. E., Risbon, R. E., Iii, R. M. F., Drobatz, K., & Clifford, C. A. (2013). *Doxorubicin and deracoxib adjuvant therapy for canine splenic hemangiosarcoma: A pilot study*. *54*, 237–242.
- Kent, M. S., Burton, J. H., Dank, G., Bannasch, D. L., & Rebhun, R. B. (2018). Association of cancer-related mortality, age and gonadectomy in golden retriever dogs at a veterinary academic center (1989-2016). *PLOS ONE*, *13*(2), e0192578.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192578>
- Kim, J., Frantz, A., Anderson, K., Graef, A., Scott, M., Robinson, S., Sharkey, L., O'Brien, T., Dickerson, E., & Modiano, J. (2014). Interleukin-8 promotes canine hemangiosarcoma growth by regulating the tumor microenvironment. *Experimental Cell Research*, *323*(1), 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.02.020>
- Kim, J., Graef, A., Dickerson, E., & Modiano, J. (2015). Pathobiology of Hemangiosarcoma in Dogs: Research Advances and Future Perspectives. *Veterinary Sciences*, *2*(4), 388–405.
<https://doi.org/10.3390/vetsci2040388>
- Kim, J., Schulte, A., Sarver, A., Angelos, M., Frantz, A., Forster, C., O'Brien, T., Cornax, I., O'Sullivan, M., Cheng, N., Lewellen, M., Oseth, L., Kumar, S., Bullman, S., Pedamallu, C., Goyal, S., Meyerson, M., Lund, T., Alfoldi, J., ... Modiano, J. (2021). Transcriptional and Functional Activity of Hemangiosarcoma Support Bone Marrow Nurse Cell Ontogeny. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.05.21.445198>
- Kirby, G. M., Mackay, A., Grant, A., Woods, P., McEwen, B., Khanna, C., Macri, J., Hayes, M. A., & Stalker, M. (2011). Concentration of Lipocalin Region of Collagen XXVII Alpha 1 in the Serum of Dogs with Hemangiosarcoma: Lipocalin and Hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *25*(3), 497–503. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0709.x>

- Kodama, A., Sakai, H., Matsuura, S., Murakami, M., Murai, A., Mori, T., Maruo, K., Kimura, T., Masegi, T., & Yanai, T. (2009). Establishment of canine hemangiosarcoma xenograft models expressing endothelial growth factors, their receptors, and angiogenesis-associated homeobox genes. *BMC Cancer*, *9*(1), 363. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-363>
- Lamerato-Kozicki, A. R., Helm, K. M., Jubala, C. M., Cutter, G. C., & Modiano, J. F. (2006). Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation. *Experimental Hematology*, *34*(7), 870–878. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.04.013>
- Lana, S., U'ren, L., Plaza, S., Elmslie, R., Gustafson, D., Morley, P., & Dow, S. (2007). Continuous Low-Dose Oral Chemotherapy for Adjuvant Therapy of Splenic Hemangiosarcoma in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *21*, 764–769.
- Lang, B. (2020). *Student Paper Communication étudiante*. *61*(1203–1205), 3.
- Lashnits, E., Neupane, P., Bradley, J. M., Richardson, T., Thomas, R., Linder, K. E., Breen, M., Maggi, R. G., & Breitschwerdt, E. B. (2020). Molecular prevalence of Bartonella, Babesia, and hemotropic Mycoplasma species in dogs with hemangiosarcoma from across the United States. *PLOS ONE*, *15*(1), e0227234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227234>
- Lim, M. A., Yang, L., Zheng, Y., Wu, H., Dong, L. Q., & Liu, F. (2004). Roles of PDK-1 and PKN in regulating cell migration and cortical actin formation of PTEN-knockout cells. *Oncogene*, *23*(58), 9348–9358. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208147>
- Lynch, A. M., O'Toole, T. E., & Hamilton, J. (2015). Transfusion practices for treatment of dogs undergoing splenectomy for splenic masses: 542 cases (2001–2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *247*(6), 636–642. <https://doi.org/10.2460/javma.247.6.636>

- Mallol, C., Gutierrez-Quintana, R., Hammond, G., Schweizer-Gorgas, D., De Decker, S., Novellas, R., Espada, Y., Oevermann, A., Ortega, M., Parry, A., Coelho, A. M., Gonçalves, R., Stalin, C., & Brocal, J. (2022). MRI features of canine hemangiosarcoma affecting the central nervous system. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, *63*(2), 185–196.
<https://doi.org/10.1111/vru.13041>
- Manno, R. A., Grasseti, A., Oberto, G., Nyska, A., & Ramot, Y. (2016). The minipig as a new model for the evaluation of doxorubicin-induced chronic toxicity: The minipig as a model for doxorubicin toxicity. *Journal of Applied Toxicology*, *36*(8), 1060–1072.
<https://doi.org/10.1002/jat.3266>
- Marconato, L., Chalfon, C., Finotello, R., Polton, G., Vasconi, M. E., Annoni, M., Stefanello, D., Mesto, P., Capitani, O., Agnoli, C., Amati, M., & Sabattini, S. (2019). 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. *Veterinary and Comparative Oncology*, *17*(4), 537–544. <https://doi.org/10.1111/vco.12519>
- Masyr, A. R., Rendahl, A. K., Winter, A. L., Borgatti, A., & Modiano, J. F. (2021). Retrospective evaluation of thrombocytopenia and tumor stage as prognostic indicators in dogs with splenic hemangiosarcoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *258*(6), 630–637. <https://doi.org/10.2460/javma.258.6.630>
- Matsuyama, A., Poirier, V. J., Mantovani, F., Foster, R. A., & Mutsaers, A. J. (2017). Adjuvant Doxorubicin with or without Metronomic Cyclophosphamide for Canine Splenic Hemangiosarcoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, *53*(6), 304–312. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6540>

- Meena, Y., Gupta, S., Mohammed, N., Meena, B., Meena, M., Devendra, Meena, Y., & Meena, S. (2022). Canine obesity-prevalence, risk factors and management: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 11(7), 662–667.
- Moore, A. S., Rassnick, K. M., & Frimberger, A. E. (2017). 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). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 251(5), 559–565.
<https://doi.org/10.2460/javma.251.5.559>
- Morgan, M. B., Swann, M., Somach, S., Eng, W., & Smoller, B. (2004). Cutaneous angiosarcoma: A case series with prognostic correlation. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50(6), 867–874. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.10.671>
- Mullin, C., & Clifford, C. (2020). Miscellaneous Tumors. Em D. Vail, D. Thamm, & J. Liptak (Eds.), *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology* (Sixth edition, pp. 773–781). Elsevier.
- Mullin, C., & Clifford, C. A. (2019). Histiocytic Sarcoma and Hemangiosarcoma Update. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 49(5), 855–879.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.009>
- Murakami, M., Sakai, H., Kodama, A., Mori, T., Maruo, K., Yanai, T., & Masegi, T. (2008). Expression of the Anti-apoptotic Factors Bcl-2 and Survivin in Canine Vascular Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 139(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.02.001>
- Mutsaers, A., & Biller, B. (2020). Molecular/Targeted Therapy of Cancer. Em D. Vail, D. Thamm, & J. Liptak (Eds.), *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology* (6.^a ed.). Elsevier.

- Naka, N., Ohsawa, M., Tomita, Y., Kanno, H., Uchida, A., Myoui, A., & Aozasa, K. (1996). Prognostic factors in angiosarcoma: A multivariate analysis of 55 cases. *Journal of Surgical Oncology*, *61*(3), 170–176. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9098\(199603\)61:3<170::AID-JSO2>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9098(199603)61:3<170::AID-JSO2>3.0.CO;2-8)
- Ng, C. Y., & Mills, J. N. (1985). Clinical and haematological features of haemangiosarcoma in dogs. *Australian Veterinary Journal*, *62*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1985.tb06029.x>
- Oakley, C., & Chretien, J. (2020). Hemangiosarcoma. Em D. Bruyette (Ed.), *Clinical Small Animal Internal Medicine* (Vol. 2). John Wiley & Sons, Inc.
- Polak, K., Acierno, M. M., Raj, K., Mizukami, K., Siegel, D. L., & Giger, U. (2015). Dog erythrocyte antigen 1: Mode of inheritance and initial characterization. *Veterinary Clinical Pathology*, *44*(3), 369–379. <https://doi.org/10.1111/vcp.12284>
- Primeau, A. J., Rendon, A., Hedley, D., Lilge, L., & Tannock, I. F. (2005). The Distribution of the Anticancer Drug Doxorubicin in Relation to Blood Vessels in Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, *11*(24), 8782–8788. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1664>
- Richter, M. (2018). Spleen. Em S. Johnston & K. Tobias (Eds.), *Veterinary Surgery Small Animal* (2.^a ed., Vol. 1–2). Elsevier.
- Rivier, P., & Monnet, E. (2011). Use of a Vessel Sealant Device for Splenectomy in Dogs: Splenectomy in Dogs. *Veterinary Surgery*, *40*(1), 102–105. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2010.00757.x>
- Robinson, K. L., Bryan, M. E., Atkinson, E. S., Keeler, M. R., Hahn, A. W., & Bryan, J. N. (2020). Neutering is associated with developing hemangiosarcoma in dogs in the Veterinary Medical Database: An age and time-period matched case-control study (1964–2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *61*, 499–504.

- Rozolen, J. M., Teodoro, T. G. W., Sobral, R. A., Sueiro, F. A. R., Laufer-Amorim, R., Elias, F., & Fonseca-Alves, C. E. (2021). Investigation of Prognostic Value of Claudin-5, PSMA, and Ki67 Expression in Canine Splenic Hemangiosarcoma. *Animals*, *11*(8), 2406. <https://doi.org/10.3390/ani11082406>
- Salt, C., Morris, P., Wilson, D., Lund, E., & German, A. (2018). Association between life span and body condition in neutered client-owned dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *33*(1), 89–99. <https://doi.org/10.1111/jvim.15367>
- Schick, A. R., Hayes, G. M., Singh, A., Mathews, K. G., Higginbotham, M. L., & Sherwood, J. M. (2019). Development and validation of a hemangiosarcoma likelihood prediction model in dogs presenting with spontaneous hemoabdomen: The HeLP score. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, *29*(3), 239–245. <https://doi.org/10.1111/vec.12838>
- Shaw, S. P., Rozanski, E. A., & Rush, J. E. (2004). *Cardiac Troponins I and T in Dogs with Pericardial Effusion*. *18*, 322–324.
- Sherwood, J. M., Haynes, A. M., Klocke, E., Higginbotham, M. L., Thomson, E. M., Weng, H.-Y., & Towle Millard, H. A. (2016). Occurrence and Clinicopathologic Features of Splenic Neoplasia Based on Body Weight: 325 Dogs (2003–2013). *Journal of the American Animal Hospital Association*, *52*(4), 220–226. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6346>
- Shiu, K.-B., Flory, A. B., Anderson, C. L., Wypij, J., Saba, C., Wilson, H., Kurzman, I., & Chun, R. (2011). Predictors of outcome in dogs with subcutaneous or intramuscular hemangiosarcoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *238*(4), 472–479. <https://doi.org/10.2460/javma.238.4.472>
- Smith, A. N. (2003). Hemangiosarcoma in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *33*(3), 533–552. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00002-](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00002-0)

- Story, A. L., Wavreille, V., Abrams, B., Egan, A., Cray, M., & Selmic, L. E. (2020). Outcomes of 43 small breed dogs treated for splenic hemangiosarcoma. *Veterinary Surgery*, *49*(6), 1154–1163. <https://doi.org/10.1111/vsu.13470>
- Tamburini, B. A., Phang, T. L., Fosmire, S. P., Scott, M. C., Trapp, S. C., Duckett, M. M., Robinson, S. R., Slansky, J. E., Sharkey, L. C., Cutter, G. R., Wojcieszyn, J. W., Bellgrau, D., Gemmill, R. M., Hunter, L. E., & Modiano, J. F. (2010). Gene expression profiling identifies inflammation and angiogenesis as distinguishing features of canine hemangiosarcoma. *BMC Cancer*, *10*(1), 619. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-619>
- Tecilla, M., Gambini, M., Forlani, A., Caniatti, M., Ghisleni, G., & Roccabianca, P. (2019). Evaluation of cytological diagnostic accuracy for canine splenic neoplasms: An investigation in 78 cases using STARD guidelines. *PLOS ONE*, *14*(11), e0224945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224945>
- Teske, E., Rutteman, G. R., Kirpenstein, J., & Hirschberger, J. (2011). A randomized controlled study into the efficacy and toxicity of pegylated liposome encapsulated doxorubicin as an adjuvant therapy in dogs with splenic haemangiosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, *9*(4), 283–289. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00266.x>
- Thamm, D., Kamstock, D., Sharp, C., Johnson, S., Mazzaferro, E., Herold, L., Barnes, S., Winkler, K., & Selting, K. (2012). Elevated serum thymidine kinase activity in canine splenic hemangiosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, *10*(4), 292–302. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00298.x>
- Tocci, L. J. (2010). Transfusion Medicine in Small Animal Practice. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *40*(3), 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.02.005>

- U'Ren, L. W., Biller, B. J., Elmslie, R. E., Thamm, D. H., & Dow, S. W. (2007). Evaluation of a Novel Tumor Vaccine in Dogs with Hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine, 21*(1), 113–120. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb02936.x>
- Vail, D., MacEwen, G., Kurzaman, I., Dubielzig, R., Helfand, S., Kisseberth, W., London, C., Obradovich, J., Madewell, B., Rodríguez, C., Fidel, J., Susaneck, S., & Rosenberg, M. (1995). Liposome-encapsulated Muramyl Tripeptide Phosphatidylethanolamine Adjuvant Immunotherapy for Splenic Hemangiosarcoma in the Dog: A Randomized Multi-Institutional Clinical Trial. *Clinical Cancer Research, 1*, 1165–1170.
- Wendelburg, K. M., O'Toole, T. E., McCobb, E., Price, L. L., Lyons, J. A., & Berg, J. (2014). Risk factors for perioperative death in dogs undergoing splenectomy for splenic masses: 539 cases (2001–2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association, 245*(12), 1382–1390. <https://doi.org/10.2460/javma.245.12.1382>
- Wong, R. W., Gonsalves, M. N., Huber, M. L., Rich, L., & Strom, A. (2015). Erythrocyte and Biochemical Abnormalities as Diagnostic Markers in Dogs With Hemangiosarcoma Related Hemoabdomen: Blood and Biochemical Markers for HSA Related Hemoabdomen. *Veterinary Surgery, 44*(7), 852–857. <https://doi.org/10.1111/vsu.12361>
- Wright, T., Singh, A., Mayhew, P. D., Runge, J. J., Brisson, B. A., Oblak, M. L., & Case, J. B. (2016). Laparoscopic-assisted splenectomy in dogs: 18 cases (2012–2014). *Journal of the American Veterinary Medical Association, 248*(8), 916–922. <https://doi.org/10.2460/javma.248.8.916>
- Yamamoto, S., Hoshi, K., Hirakawa, A., Chimura, S., Kobayashi, M., & Machida, N. (2013). Epidemiological, Clinical and Pathological Features of Primary Cardiac Hemangiosarcoma in Dogs: A Review of 51 Cases. *Journal of Veterinary Medical Science, 75*(11), 1433–1441. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0064>

- Yonemaru, K., Sakai, H., Murakami, M., Kodama, A., Mori, T., Yanai, T., Maruo, K., & Masegi, T. (2007). The Significance of p53 and Retinoblastoma Pathways in Canine Hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(3), 271–278. <https://doi.org/10.1292/jvms.69.271>
- Yonemaru, K., Sakai, H., Murakami, M., Yanai, T., & Masegi, T. (2006). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Basic Fibroblast Growth Factor, and Their Receptors (Flt-1, Flk-1, and Flg-1) in Canine Vascular Tumors. *Veterinary Pathology*, 43(6), 971–980. <https://doi.org/10.1354/vp.43-6-971>
- Yuki, M., Machida, N., Sawano, T., & Itoh, H. (2011). Investigation of serum concentrations and immunohistochemical localization of α 1-acid glycoprotein in tumor dogs. *Veterinary Research Communications*, 35(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11259-010-9445-7>