

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y PATOLÓGICO DE LOS HEMANGIOMAS Y
HEMANGIOSARCOMAS CUTÁNEOS CANINOS EN URUGUAY**

Dra. María Belén Varela Cruces, DCV

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2023

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y PATOLÓGICO DE LOS HEMANGIOMAS Y
HEMANGIOSARCOMAS CUTÁNEOS CANINOS EN URUGUAY**

Dra. María Belén Varela Cruces, DCV



Kanji Yamasaki
Director de Tesis



José Manuel Verdes
Co-director

2023

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Prof. Agr. Dra. Paula Pessina. Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Dra. Carolina Matto. Patóloga Veterinaria. Dirección de Laboratorios Veterinarios. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (DILAVE. MGAP). Paysandú, Uruguay.

Prof Dr. Claudio Barbeito. Instituto de Patología General. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Unidad de Posgrados

Oficina de Posgrados

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**"ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y PATOLÓGICO DE LOS HEMANGIOMAS Y
HEMANGIOSARCOMAS CUTÁNEOS CANINOS EN URUGUAY"**

Por: DCV. María Belén Varela Cruces

Director de Tesis: Dr. Kanji Yamasaki

Codirector de Tesis: Dr. José Manuel Verdes

Tribunal

Presidente: Prof. Agr. Dra. Paula Pessina

Segundo Miembro: Dra. Carolina Matto

Tercer Miembro Prof Dr. Claudio Barbeito

Fallo del Tribunal:



Centro de Posgrados
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE MAESTRIA

ORIENTACIÓN: SALUD ANIMAL

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:

TRIBUNAL: PAULA PESSINA, CLAUDIO BARBEITO, CAROLINA MATTO

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4605929 - 7	VARELA CRUCES, MARÍA BELÉN	S.S.S	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

TRIBUNAL

FIRMA

Dra. Paula Pessina

Dra. Carolina Matto

Dr. Claudio Barbeito

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Posgrados Académicos y Especializaciones

La tesis defendida el día 20 de diciembre del año dos mil veintitrés por la Dra. Belén Varela, la cual se titula “Estudio epidemiológico y patológico de los hemangiomas y hemangiosarcomas cutáneos caninos en Uruguay”, aborda distintos aspectos acerca de la presentación de estas neoplasias tanto del punto de vista epidemiológico como de su diagnóstico.

El tribunal considera que la Dra. Belén Varela ha realizado un trabajo de tesis adecuado para la obtención del título, demostrando sólido conocimiento del tema, acompañada de una buena revisión bibliográfica que busca sustentar los objetivos planteados. Se sugiere la incorporación de bibliografía recientemente publicada en la temática.

Los resultados del trabajo son muy interesantes y relevantes para el diagnóstico y pronósticos de las neoplasias abordadas. Se destaca la calidad de las imágenes incorporadas en el texto.

La redacción de la tesis está realizada en forma correcta con algunas observaciones editoriales. No obstante entendemos debe ser mejorada principalmente ajustando la terminología al diseño planteado y profundizando algunos aspectos conceptuales. Estos deben ser corregidos antes de la entrega del manuscrito definitivo.

Respecto a la presentación oral la Dra. Varela fue muy clara y ordenada, sustentada en una excelente calidad de la presentación. La estudiante mostró conocimiento de su trabajo al momento de presentar sus resultados y fue capaz de responder con solidez a las preguntas planteadas por el tribunal.

Si bien no es requisito para la aprobación de la tesis, se presenta una comunicación corta (case report) que se desprende en cierta forma del trabajo de tesis realizado, lo que este tribunal considera muy valioso para su formación y para la difusión de los resultados.

En suma, el tribunal en forma unánime, considera que la Dra. María Belén Varela ha realizado un muy buen trabajo de tesis de Maestría y por lo

anteriormente expresado se le otorga la calificación de Aprobado con mención.



Dra. Paula Pessina

Presidente del Tribunal

20 de diciembre de 2023

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por darme con tanto amor la oportunidad y el apoyo para continuar mi formación, por siempre alentándome a progresar y ser una mejor profesional. A mis hermanos (Martín, Andrés y Ximena) por inspirarme, animarme y preocuparse en este proceso de aprendizaje. A mis sobrinas por ser la luz de mis ojos, mi alegría de todos los días. A mis amigas del alma (Camila, Tatiana, Araceli, Emilia, Florencia) y a mis amigas y hermanas de carrera (Soledad, Camila, Fernanda) por siempre apoyarme, estar en los momentos de logros y felicidad; y en los momentos de frustración y caos, con mucha manifestación de estrés. Por siempre tener una visión positiva, divertida y alentadora. A Gonzalo que desde el primer día y todos los días, en prácticas de navegación luego de una ardua jornada laboral, me escuchaba atentamente con mucha paciencia, me daba consejos y me alentaba a continuar, siempre optimista y con una fe incondicional. A mi tutor Kanji por enseñarme con tanta humildad, por guiarme con tanta sabiduría y cuidarme con tanto cariño en este difícil proceso, repleto de obstáculos de todo tipo. Por nunca abandonarme y volver desde el lado opuesto del globo terráqueo. A mi cotutor José, por siempre alentarme y tener tanta paciencia. Por todo el apoyo, atención y preocupación. Agradezco profundamente mis amigas y compañeras de trabajo: Camila Larrañaga, Victoria Yozzi, Cecilia Abreu por ser extremadamente empáticas y soportar tantos cambios de humor, por alentarme y preocuparse. Por compartir todo su conocimiento, su raciocinio, sus destrezas y ayudarme con tanta dedicación, humildad y sabiduría en el trabajo de laboratorio y en el de redacción.

A todos y cada uno de ellos mis mas profundos sentimientos de amor y gratitud.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTADO DE ABREVIACIONES y DEFINICIONES.....	ii
RESUMEN.....	iii
SUMMARY.....	v
1. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	1
1.1 – EPIDEMIOLOGÍA.....	1
1.2 – DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO.....	3
1.3 – DIAGNÓSTICO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	4
1.4 – PRONÓSTICO.....	4
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 – GENERAL.....	7
3.2 – ESPECÍFICOS.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
4.1 – ANIMALES Y SELECCIÓN DE MUESTRAS.....	8
4.2 – PROCESAMIENTO HISTOPATOLÓGICO.....	8
4.3 – INMUNOHISTOQUÍMICA.....	8
4.4 – ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	9
5. RESULTADOS.....	11
5.1 – ESTUDIO POBLACIONAL.....	11
5.2 – HISTOPATOLOGÍA.....	12
5.3 – INMUNOHISTOQUÍMICA.....	21
6. DISCUSIÓN.....	26
7. CONCLUSIONES.....	29
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
9. LISTADO DE ANEXOS.....	40

RESUMEN

Los hemangiomas y hemangiosarcomas son tumores mesenquimales provenientes del endotelio vascular, ocupando una posición importante y de alta frecuencia en caninos en todo el mundo, constituyendo entre el 10 y el 15 % de los tumores cutáneos diagnosticados en el Laboratorio de Diagnóstico Anatomopatológico de la FVET-Udelar. La clasificación de estos tumores ha sido una fuente de controversia obstaculizando a menudo el adecuado pronóstico.

Examinamos y definimos histopatológicamente el grado de diferenciación de 25 hemangiomas y 24 hemangiosarcomas dérmicos de caninos recibidos en la Unidad Patología de la FVET-Udelar desde el año 2018 al 2020, utilizando la técnica de tinción Hematoxilina - Eosina, la técnica de tinción especial Tricrómica de Masson, así como la inmunohistoquímica contra factor VIII, CD31 y CD34 como herramientas complementarias. Además, recabamos la información epidemiológica de cada caso en estudio.

Durante los tres años en estudio, de 446 perros con tumores de piel, veinticinco fueron diagnosticados como hemangiomas y veinticuatro como hemangiosarcomas. La edad promedio de los perros diagnosticados con hemangioma y hemangiosarcoma fue de 8.36 ± 2.08 y 8.7 ± 2.5 , respectivamente, y la edad promedio de los caninos con hemangiosarcoma pese a ser 0.34 años menor que la de los caninos que presentaban hemangiomas cutáneos, no fue estadísticamente significativa ($p = 0.597$). Ambos tumores fueron más frecuentemente observados en el tronco y las extremidades. No se detectó predilección respecto al género. Histológicamente, el tipo mixto (capilar y cavernoso) fue el hemangioma más frecuentemente observado, mientras que, para los hemangiosarcomas, el tipo mixto (capilar, cavernoso y sólido) y el tipo mixto (cavernoso y sólido) fueron los más observados. Además, se diagnosticó con frecuencia el hemangiosarcoma de tipo epiteliode. La inmunohistoquímica reveló una tinción citoplasmática fuerte para el antígeno relacionado con el factor VIII y el antígeno de CD31 en las células neoplásicas en todos los tipos tumorales. Sin embargo, no hubo reactividad positiva en células neoplásicas para el anticuerpo contra CD34 con la técnica utilizada. Este es el primer estudio epidemiológico e histopatológico de tumores vasculares en piel de caninos en Uruguay, realizándose la puesta a punto de las técnicas específicas de inmunohistoquímica para la tipificación de estos tipos tumorales en el laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria, Udelar.

SUMMARY

Hemangiomas and hemangiosarcomas are mesenchymal tumors originating from the vascular endothelium, occupying an important and high frequency position in canines throughout the world, constituting between 10 and 15% of skin tumors diagnosed in the Anatomopathological Diagnostic Laboratory of the FVET-Udelar. The classification of these tumors has been a source of controversy, often hindering an adequate prognosis.

We examined and histopathologically defined the degree of differentiation of 25 dermal hemangiomas and 24 hemangiosarcomas of canines referred to the Pathology Unit of the FVET-Udelar from 2018 to 2020, using the Hematoxylin - Eosin stain, the Masson's Trichrome special stain, as well as immunohistochemistry against factor VIII, CD31 and CD34 as complementary tools. In addition, we collected epidemiological information for each case under study.

During the studied three years, of 446 dogs with skin tumors, twenty-five were diagnosed as hemangiomas and twenty-four as hemangiosarcomas. The average age of the dogs diagnosed with hemangioma and hemangiosarcoma was 8.36 ± 2.08 and 8.7 ± 2.5 , respectively, and the average age of the canines with hemangiosarcoma, despite being slightly older than that of the canines that presented cutaneous hemangiomas, was not statistically significant ($p = 0.597$). Both tumors were most frequently observed on the trunk and extremities. No gender predilection was detected. Histologically, the mixed type (capillary and cavernous) was the most frequently observed hemangioma, while for hemangiosarcomas, the mixed type (capillary, cavernous and solid) and the mixed type (cavernous and solid) were the most observed. In addition, epithelioid-type hemangiosarcoma was frequently diagnosed. Immunohistochemistry revealed strong cytoplasmic staining for factor VIII-related antigen and CD31 antigen in neoplastic cells in all types. However, there was no positive reactivity in neoplastic cells for the antibody against CD34 with the technique used. This is the first epidemiological and histopathological study of vascular tumors in the skin of canines in Uruguay, with the development of specific immunohistochemistry techniques for the typification of these tumor types, carried out in the Pathological Anatomy laboratory of the Faculty of Veterinary, Udelar.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

Los tumores agresivos y malignos de células endoteliales de origen vascular en la piel de humanos u otras especies animales son denominados angiosarcomas cutáneos. Para el caso de los humanos, alrededor del 2% de los sarcomas de tejidos blandos, y el 5.4% de los sarcomas de tejidos blandos cutáneos, son angiosarcomas (Young et al. 2010). La incidencia de estos tumores tanto en los humanos como en los animales domésticos ha aumentado en los últimos 30 años, sin conocerse aún la causa. Para la especie humana, no hay una predisposición asociada al género, presentándose con una frecuencia similar entre el hombre y la mujer, pudiendo desarrollarse a cualquier edad, aunque son más comunes en pacientes mayores, de piel blanca y en la zona de la cabeza (Young et al. 2010; Rouhani et al. 2008). Estos tumores son muy agresivos con una supervivencia global a los 5 años de entre el 20% y el 35% para todos los casos (Mansfield et al. 2020). Son más comunes en adultos y son extremadamente raros en niños. La mayoría de los angiosarcomas afectan la piel y tejidos blandos superficiales.

Además de los hemangiosarcomas, en humanos también son frecuentes los hemangiomas, estos tumores vasculares son lesiones benignas superficiales que típicamente comprometen las extremidades, se pueden encontrar tanto en niños como en adultos. La extirpación quirúrgica suele ser curativa (Mansfield et al. 2020). Tanto en los humanos como en los animales domésticos (por ejemplo, en los bovinos), existen registros de tumores vasculares congénitos con regresión espontánea como, por ejemplo, se ha reportado para el hemangioma cutáneo (Priestnall et al. 2010).

Existen registros de ambos tipos de tumores vasculares en caninos, equinos y bovinos, con características similares a los tumores vasculares de tipo epitelioides en humanos (Warren et al. 2007).

En cuanto a los tumores vasculares en gatos, los mismos no son tan frecuentes como en humanos o caninos y acometen con mayor frecuencia a los machos adultos. No se ha identificado ningún sitio de predilección, ni factores predisponentes para los hemangiomas en esta especie, sin embargo, la aparición de hemangiosarcomas en sitios de pelo blanco de la cabeza se lo ha asociado a la irradiación solar crónica, presentando alta recurrencia (Miller et al. 1992).

Por otra parte, a pesar de que las cabras desarrollan la gama de anomalías del crecimiento vascular observadas en los animales domésticos anteriormente nombrados, los tumores vasculares parecen ser raros en esta especie (Bildfell et al. 2002).

En este sentido, entre todas las especies domésticas, los caninos son los más afectados por estos tumores (Mullin et al. 2019), habiéndose reportado casuística desde hace muchos años (Oksanen 1978). La incidencia reportada es de 2.8% y ha ido en aumento en los últimos años (Mullin et al. 2019; Gruntzig et al. 2016).

En base a su apariencia histológica, los hemangiomas y hemangiosarcomas caninos son tumores que surgen de las células endoteliales vasculares (Hendrick 2016) o a partir de precursores de la médula ósea, que detienen su diferenciación en el hemangioblastoma (Mullin et al. 2016; Lamerato Kozichi et al. 2006). A su vez, a partir de estudios moleculares, existen planteos de que los hemangiosarcomas caninos surgen de células madre multipotenciales, capaces de diferenciarse en tres subtipos de tumores distintos asociados con angiogénesis, inflamación y adipogénesis (Gorden et al. 2014). Los hemangiomas, pueden ser únicos o múltiples, encontrándose en cualquier parte de la piel (Hendrick 2017; Soares et al. 2017). Por otro lado, las ubicaciones primarias más frecuentes de los hemangiosarcomas caninos son el bazo (Varela et al 2022; Fernández et al 2019; Leyva et al 2018), y este tumor también se ha presentado en otros órganos viscerales, como el corazón (Osuga et al. 2017; Yamamoto 2013), mediastino (Sitjar et al 2019), el hígado (Leyva et al. 2018), los riñones y pulmones (Soares et al. 2017), la lengua (Burton et al. 2012; Syrcle et al. 2008), el tracto intestinal (Iwata et al 2018), y en órganos genitales como el pene (Burchell et al. 2014; Marolf et al 2006) y glándulas sexuales como la próstata (Della Santa et al. 2008), vejiga urinaria (Lptak et al. 2004), sistema nervioso central (Paek et al. 2015) y sistema vascular (Guinan et al. 2012; Pharr et al. 1992). Además, existen varios reportes que confirman que un sitio típico de aparición es la piel (Hendrick 2017; Schultheiss et al 2004). Siendo la localización más frecuente la piel del abdomen, seguida de la piel de los órganos sexuales, miembros, cabeza y cola (Santos et al. 2020; Soares et al 2017). Por otro lado, también se dice que algunos hemangiomas y hemangiosarcomas dérmicos caninos aparecen como resultado de la irradiación solar crónica o daño solar (Nobrega et al. 2019). Se plantea desde hace años la existencia de una asociación significativa entre la ocurrencia de hemangiosarcomas y la dermatosis solar en la piel glabra abdominal, así como entre la ocurrencia de hemangiomas y dermatosis solar en la piel de otras partes del cuerpo (Nikula et al. 1992). En este sentido, se ha informado que aquellas razas de perros de pelo corto y piel clara como: Galgo, Whippets y American Pitbull Terrier, tienen un mayor riesgo de desarrollar hemangiosarcomas (Santos et al 2020; Hargis et al 1992). Por otra parte, algunos autores postulan que la incidencia de hemangiomas es mayor en hembras que en machos (Nikula et al. 1992) y otros plantean lo opuesto (van der Gaag et al. 1989), mientras que la mayoría de los reportes plantean que no existen diferencias estadísticas en cuanto a la aparición de estos tumores en los distintos sexos (Nobrega et al 2019; Soares et al 2017; Sabattini 2009; Schultheiss et al. 2004; Smith et al. 2003), siendo la media de edad de aparición de estos tumores en los caninos afectados de 8 a 9 años (Santos et al 2020; Nobrega et al. 2019; Grtuzig et al 2017; Soares et al. 2017; Shiu et al. 2011; Trappler 2010 Sabattini 2009; Smith et al. 2003; Ward et al. 1994; Waller et al. 1967).

1.2. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

El diagnóstico definitivo de hemangiomas y hemangiosarcomas es mediante histopatología convencional con Hematoxilina-Eosina (HE). Los resultados citológicos en los tumores vasculares suelen ser muy heterogéneos y presentar contaminación sanguínea, además, las estructuras formadoras de vasos no siempre son evidentes y existen hemangiosarcomas atípicos o pobremente diferenciados con patrones epitelioides que dificultan su identificación y caracterización mediante esta técnica diagnóstica (Bertazzolo et al. 2005; Smith et al. 2003). Usando la tomografía computarizada como herramienta diagnóstica de este tipo tumoral, se ha demostrado que no existen características distintivas únicas de imagen para el hemangiosarcoma no parenquimatoso en perros (Fukuda et al. 2014).

Histológicamente, los tumores vasculares bien diferenciados son áreas compuestas por células endoteliales neoplásicas que forman múltiples estructuras similares a canales vasculares anastomosados irregularmente con contenido eritrocitario en su mayoría y separados por trabéculas de tejido conectivo, a veces acompañados de zonas sólidas compactas (Mullin et al 2019; Bertazzolo et al. 2005), las células en cuestión a menudo pueden contener hemosiderina (Oksanen et al 1978). Los estudios morfológicos de estos tumores en la piel se han realizado durante mucho tiempo y los hemangiomas se clasifican como de tipo capilar o cavernoso según el tamaño de los espacios vasculares y la cantidad de estroma (Hargis et al 1992; van der Gaag et al 1989). Existen casos en que el tumor muestra características de más de un tipo, por ejemplo, un hemangioma cavernoso puede mostrar características del tipo capilar en los bordes del tumor (van der Gaag et al. 1989). La clasificación histológica de los hemangiosarcomas ha sido por mucho tiempo motivo de controversia. El hemangiosarcoma se clasifica en 2 a 4 tipos según las características morfológicas y el patrón de crecimiento de las células tumorales (Valli et al 2017; Kim et al 2015). Morfológicamente pueden tener aspecto capilar, cavernoso o sólido y las células malignas pueden ser muy pleomórficas con características que recuerdan a las vistas en otros sarcomas (Kim et al 2015). A su vez, estos tumores suelen presentar infiltrado inflamatorio de discreto a manifiesto, a predominio de células linfoplasmocíticas, necrosis y hemorragia (van der Gaag et al. 1989). Existe una variante de hemangiosarcoma epiteliode, poco diferenciado, que aparece compuesta por sólidos cordones de células neoplásicas de aspecto epiteliode, conservando la capacidad de formar canales vasculares. Este tipo muestra invasividad e índice mitótico muy alto, lo que indicaría un comportamiento biológico agresivo (Bertazzolo et al. 2005). Esta variante histológica de hemangiosarcoma, rara vez se ha informado en la literatura veterinaria, siendo reportada en perro, caballo y vaca (Bolfi et al. 2018; Warren et al. 2007), y puede plantear un desafío diagnóstico en el examen histopatológico y citológico (Shor et al 2009; Antonescu et al. 2014; Ko et al. 2015). Las células que lo componen suelen ser redondas a poligonales con abundante citoplasma eosinofílico y núcleo vesicular, se han descrito patrones de crecimiento nodular, micronodular, sincitial y difuso (Shustef et al. 2017), otras variantes citomorfológicas incluyen células espumosas, de anillo de sello y células granulares (Warren et al. 2007).

1.3. DIAGNÓSTICO INMUNOHISTOQUÍMICO

El diagnóstico de tumores vasculares puede realizarse de forma sensible, pero poco específica, usando la inmunohistoquímica, mediante el marcaje de células endoteliales neoplásicas contra factor de Von Willebrand, más conocido como factor VIII (Beust et al. 1988) y también contra CD31 que da una reacción más específica, intensa y, por tanto, con tinción de fondo débil en comparación con la anterior (Subapriya et al. 2020; Ramos-Vara et al. 2018; Jennings et al. 2012). Sea cual sea el enfoque de diagnóstico empleado, se justifica el uso de la inmunohistoquímica con ambos anticuerpos en todos los casos de caninos con esta enfermedad, aunque no se justifica cuando se emplea el anticuerpo contra CD34 (Jennings et al., 2012; Bertazzolo et al., 2005). Este mismo principio se aplica en el caso de la especie humana (Miettinen et al., 1994).

Jennings et al. (2012) realizaron un estudio comparativo de la sensibilidad y especificidad relativa de estos tres marcadores inmunohistoquímicos en neoplasias vasculares en felinos, sin embargo, no existe ningún estudio similar que compare los anticuerpos anteriormente mencionados en la población canina afectada por hemangiomas y hemangiosarcomas cutáneos.

1.4. PRONÓSTICO

Los hemangiosarcomas son neoplasias vasculares altamente malignas, con pronóstico infausto, que pueden alterar los parámetros sanguíneos y generar metástasis temprana y agresiva en uno o más órganos (Nobrega et al. 2019; Shiu et al. 2011; Snyder et al. 2008). El hígado, epiplón y pulmones son las localizaciones más frecuentes de metástasis, el hemangiosarcoma canino es el tumor intracraneal metastásico más común (Mullin et al. 2019; Oksanen et al. 1978). Además, los hemangiosarcomas dérmicos inducidos por radiación solar pueden tener altas tasas de recurrencia y los caninos con este tumor que no tienen incidencia de rayos ultravioletas presentan riesgo de metástasis y menor supervivencia (Szivek et al. 2011). El tiempo de supervivencia de los caninos afectados depende del control local, el tamaño tumoral, la presencia o ausencia de metástasis en el momento del diagnóstico y la presencia o ausencia de enfermedad macroscópica asociada (Shiu et al. 2011). La quimioterapia con vincristina, doxorubicina y ciclofosfamida combinadas ha sido probada con eficacia en el tratamiento contra hemangiosarcomas (Bulakowski et al. 2008; Weisse et al. 2005; Hammer et al. 1991), sin embargo, la misma ha provocado riesgosos efectos secundarios, y en conjunto con la cirugía, han tenido un éxito limitado en la prolongación de los tiempos de supervivencia y aumento de calidad de vida en pacientes caninos con hemangiosarcomas (Smith et al. 2003). Diversas investigaciones que emplean enfoques multimodales y se centran en comprender los procesos moleculares que desencadenan la propagación metastásica, especialmente aquellos que buscan inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos, muestran ser más seguras y ofrecen perspectivas alentadoras en el tratamiento de estos tipos de tumores (Smith et al., 2003; Clifford et al., 2000). Actualmente algunas modalidades que involucran la terapia metronómica, terapia dirigida, inmunoterapia y radioterapia están bajo investigación y son potenciales soluciones para las neoplasias

vasculares (Griffin et al. 2020). El diagnóstico temprano de los hemangiosarcomas, sería útil para los veterinarios y propietarios en la toma de decisiones antes de embarcarse en procedimientos complejos y prolongados en el tiempo frente a esta enfermedad con pronóstico de reservado a grave (Smith et al. 2003).

La frecuencia relativa de estos tumores ha aumentado en los últimos años (Grutzig et al 2016). Es por ello que este estudio se realizó con el objetivo de aclarar los cambios epidemiológicos característicos de la especie canina, contemplando parámetros como la raza, la edad, el sexo y las distribuciones anatómicas y definir las características anatomopatológicas de estos tumores en caninos, utilizando para ello, los materiales quirúrgicos recibidos para diagnóstico histopatológico en el laboratorio de la Unidad Académica de Patología de la FVET-Udelar desde el 2018 a 2020.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tumores vasculares son de altas frecuencia en diversas especies animales alrededor del mundo siendo el hemangiosarcoma cutáneo una neoplasia con comportamiento altamente maligno y diagnóstico controversial, que dificulta la toma de decisión respecto a tratamientos específicos. Tanto los hemangiomas como los hemangiosarcomas cutáneos son una de las neoplasias de piel más frecuentemente diagnosticadas en caninos de Uruguay. Su alta incidencia, el aumento de los casos en los últimos años y su relación con el incremento en el impacto de radiación UV es una preocupación real y actual en la medicina veterinaria. Hasta ahora en el Uruguay, no se han realizado estudios retrospectivos de estas neoplasias cutáneas basados en el diagnóstico histopatológico, siendo este, el primer trabajo que analiza conjuntamente los datos epidemiológicos e histopatológicos de estos tumores vasculares cutáneos en caninos, usando para ello, la información de los pacientes brindada al momento de remitir las piezas quirúrgicas para su estudio en el Laboratorio de la Unidad Académica de Patología del Departamento de Patobiología de la FVET-Udelar desde el año 2018 al 2020. El conocimiento obtenido sobre la arquitectura tisular, nos permitirá profundizar en el entendimiento de la enfermedad y será posible, en base a ello, elaborar un abordaje específico para el consenso diagnóstico entre patólogos y oncólogos, para interactuar mejor en la prevención y el tratamiento de estos tumores.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Examinar y esclarecer los cambios epidemiológicos como la edad, sexo, raza, localización anatómica y las características anatomopatológicas de los tumores vasculares cutáneos en piezas quirúrgicas recibidas en el Laboratorio de anatomía patológica de la Facultad de Veterinaria Udelar.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar los datos epidemiológicos de los caninos que padecen hemangiosarcomas y hemangiomas cutáneos cuyas muestras tumorales fueron remitidas al Laboratorio de Patología de la FVET-Udelar desde el año 2018 al 2020.

Determinar la frecuencia de aparición y el grado de diferenciación histopatológico mediante la tinción de rutina HE, tinción especial tricrómica de Masson y marcación inmunohistoquímica contra Factor VIII, CD31 y CD34 de todos los hemangiosarcomas y hemangiomas cutáneos caninos recibidos en el Laboratorio de Patología de la FVET-Udelar desde el año 2018 al 2020.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ANIMALES Y SELECCIÓN DE MUESTRAS

En el presente estudio se seleccionaron 25 muestras de hemangiomas dérmicos y 24 de hemangiosarcomas dérmicos de caninos, del archivo del Laboratorio de la Unidad Académica de Patología (Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República), diagnosticados entre 2018 y 2020. Se recopiló y analizó la información epidemiológica (sexo, edad, raza y localización anatómica del tumor) de cada canino.

4.2. PROCESAMIENTO HISTOPATOLÓGICO

Todos los diagnósticos de hemangioma y hemangiosarcoma cutáneos se hicieron a partir de muestras de tumores extraídos quirúrgicamente en clínicas veterinarias privadas, fijadas en formalina tamponada al 10% y remitidas al Laboratorio de Patología de la Facultad de Veterinaria, Udelar. Fueron procesadas mediante el procedimiento habitual de inclusión en parafina, seccionadas (3 μ m) y teñidas con HE (Ver Anexo). Los preparados histológicos fueron reevaluados bajo microscopio óptico por tres observadores independientes de forma independiente, para confirmar el diagnóstico y evaluar las características histopatológicas de cada tipo tumoral. Además, dichas muestras fueron teñidas con la tinción Tricrómica de Masson, una técnica especial para evidenciar las fibras colágenas (ver anexo).

De acuerdo a reportes previos (Hargis et al 1992; van der Gaag et al 1989), los hemangiomas fueron clasificados en los tipos: capilar, cavernoso y mixto según el tamaño de los espacios vasculares y la cantidad de estroma. Mientras que los hemangiosarcomas se diferenciaron en los tipos: capilar, cavernoso, sólido y epitelioides (Valli et al 2017; Kim et al 2015; Gordon et al 2014; Dickerson et al 2005). En los casos donde se identificaron patrones mixtos, integrados por diferentes componentes celulares de los diferentes tipos de angiosarcomas descritos previamente, se adoptó la clasificación del tipo más agresivo presente en el preparado histológico. Por ejemplo, se clasificó como de tipo cavernoso cuando los tipos capilar y cavernoso se encontraron presentes en la misma lámina histológica, mientras que el tipo sólido se usó cuando se encontraron componentes de los tipos capilar, cavernoso y sólido en el mismo preparado.

4.3. INMUNOHISTOQUÍMICA

La expresión de los marcadores contra factor VIII, CD31 y CD34 fue evaluada en las muestras seleccionadas según protocolos establecidos previamente por otros autores (Jennings et al. 2012; Ramos-Vara et al 2010; Ramos-Vara y Beissenherz 2000). Para este estudio, las secciones de tejido se desparafinaron con xilol y se hidrataron a través de una serie decreciente en graduación de pasajes en etanol (100°, 95°, 70°). Se realizó un pre-tratamiento de bloqueo de la peroxidasa al 3%, luego se llevó a cabo la recuperación antigénica mediada por calor en una vaporera (Panavox, China), manteniendo las láminas histológicas sumergidas en tampón citrato 0,01 M a pH 6,0 en el interior de una jarra Coplin de polipropileno (Deltalab, España) durante 20 min. Se colocó el anticuerpo primario sobre la muestra del preparado, y se las dejó en cámara húmeda a 4 °C toda la noche. A la mañana siguiente, se le adicionó el sistema de detección Labeled Streptavidin Biotin, DAKO (LSAB+) y Estreptavidina peroxidasa. La visualización del marcaje se logró a partir de la utilización de Diaminobencidina durante 3 a 5 min., controlando la evolución del proceso por la observación permanente del preparado bajo microscopio. La contratinción de las muestras se efectuó con hematoxilina de Mayer.

Los controles positivos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario por PBS en muestras de los mismos tejidos, que fueron corridas en paralelo y en los mismos tiempos que las muestras a las que se le adicionó el anticuerpo primario. El grado de inmunoreactividad fue evaluado en base a la presencia o ausencia de reacción, localización celular específica e intensidad de la marcación.

Las imágenes digitales se obtuvieron de los preparados histológicos e inmunohistoquímicos mediante software de captura de cámara digital (AmScope MU853B Cámara digital USB 3.0 de alta velocidad de 8.5MP, China) conectada a un microscopio (Olympus BX41, Japón).

Tabla 1. Técnica de Inmunohistoquímica para tumores vasculares cutáneos en caninos

Anticuerpo	Fuente animal	Fuente del Anticuerpo/Código	Recuperación antigénica	Dilución	Tiempo de incubación	Sistema de detección
factor VIII	Policlonal de Conejo	Dako, Carpinteria, CA, A0082	Borg Decloaker RTU	1:100	Overnight	LSAB +
CD34	Monoclonal de Ratón (ICO115)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, sc-7324	Borg Decloaker RTU	1:25	Overnight	LSAB+
CD31	Monoclonal de Ratón (JC70A)	Dako, Carpinteria, CA, M0823	Borg Decloaker RTU	1:25	Overnight	LSAB+

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A partir de los datos previamente descritos, fueron utilizados estadísticos descriptivos para las variables categóricas (sexo, edad, raza y localización de los tumores). Para verificar la existencia de diferencias entre las edades del grupo de animales con hemangiomas y el de hemangiosarcomas, se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes. Para ello se usó el software estadístico computacional Past® 4.03 (Statistical analysis APP for Windows, de acceso libre). Se utilizó un intervalo de confianza de 95% y el nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDIO POBLACIONAL

Hemangioma

Los resultados de sexo, edad, raza y localización de los tumores se encuentran en la Tabla 2. Veinticinco casos de 446 tumores de piel fueron diagnosticados como hemangiomas (5.8%). La edad media de los perros con diagnóstico de hemangioma fue de 8.36 ± 2.08 años ($n=25$, rango de 5 a 15 años). En lo que respecta a la incidencia de razas específicas o cruza no definidas, de la totalidad de casos en este estudio, 44% eran cruza no definidas. Dentro de las razas específicas, Pastor Alemán ($n=3$) fue el de mayor incidencia (12%), en una segunda categoría las siguientes razas ocuparon un 24%: Boxer ($n=2$), Cocker Spaniel ($n=2$) y Sharpei ($n=2$), cada una con un 8%, 5 animales de otras razas distintas como por ejemplo Golder Retriever, Labrador Retriever, Shis Tzu, Dachshund, y otros ocuparon una tercera categoría sumando un 3%.

En referencia al género de los animales incluidos en el estudio, la relación macho: hembra fue de 1:1.

Con respecto a la localización anatómica, el 40% de los tumores estudiados fueron ubicados en las extremidades, continuando en incidencia los hallados en el tronco (36 %), cuello (12 %). En 12% de los casos carecía de registro respecto a la ubicación anatómica del hemangioma.

Hemangiosarcoma

Cada dato de raza, sexo, localización anatómica o tipo histológico se muestra en la Tabla 2. De 30 animales diagnosticados con hemangiosarcoma durante el periodo de estudio, 24 muestras de caninos diagnosticadas como hemangiosarcomas cutáneos fueron utilizadas en este estudio (80%). Los hemangiosarcomas de piel diagnosticados durante el período de estudio representaron 5.3% de todos los tumores de piel.

La edad media de los perros con hemangiosarcoma fue de $8,7 \pm 2.5$ años ($n=24$), rango de 5 a 13 años). Del total de casos estudiados, 58% eran animales con raza definida y el restante 42% eran cruza no definidas.

Con respecto a las razas, Pitbull Terrier ($n=3$), Labrador Retriever ($n= 2$) y Boxer ($n = 2$) fueron las de mayor aparición representando el 29% del total (cada una representó el 13 y 8% respectivamente). Además, en una segunda categoría de incidencia de hemangiosarcomas, encontramos que otro 29% lo constituyeron las razas Galgo ($n = 1$), Whippet ($n = 1$), Rottweiler ($n = 1$) y Golden Retriever ($n = 1$), Ovejero Alemán ($n=1$), Pastor Inglés ($n=1$), Weimaraner ($n=1$) cada una con un 4,2% del total.

En cuanto al género, la proporción de perros macho y hembra fue de 1:0,7, representando las hembras el 58% de los animales con hemangiosarcoma.

En cuanto a la localización anatómica, la ubicación en el tronco representó el 50% de los tumores estudiados, mientras que los casos restantes se presentaron en extremidades (34%) y en escroto (8%). En uno de los casos (4%) no se informó por parte del remitente la ubicación anatómica.

La comparación de las edades del grupo con hemangiomas y la del grupo de hemangiosarcomas no mostraron diferencia significativa ($p = 0.597$).

5.2. HISTOPATOLOGÍA

Hematoxilina-Eosina

Hemangiomas

Los hemangiomas diagnosticados se clasificaron en tipos capilar, cavernoso y mixto (Fig.1A-C) según el tamaño de los espacios vasculares y la cantidad de estroma. Se observaron de tipo capilar en 1 caso, cavernoso en otros 2 casos, y tipo mixto en los restantes 23 casos.

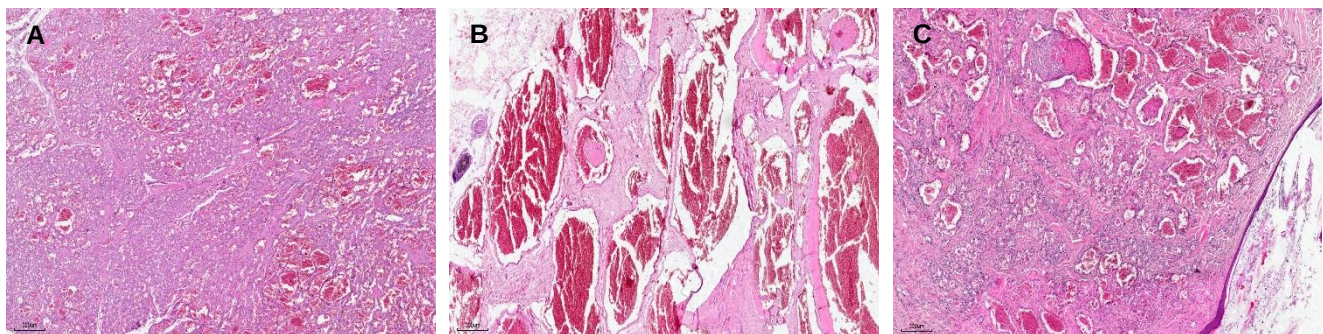


Fig. 1. Preparados histológicos teñidos con HE de distintos tipos de hemangiomas cutáneos caninos. **A:** Se observa un hemangioma tipo capilar compuesto por vasos de pequeño tamaño y escaso tejido conectivo. **B:** Hemangioma tipo cavernoso presenta vasos sanguíneos de mayor calibre y gran cantidad de tejido conectivo. **C:** El hemangioma tipo mixto suele presentar una combinación de ambos tipos con vasos de calibre variable.

En el tipo capilar, los tumores se formaron con capilares de pequeño tamaño con contenido eritrocitario, el tamaño de los vasos sanguíneos fue menor que los del tipo cavernoso (Figura 2). El tejido conjuntivo perivascular fue escaso y no característico, y en algunos casos existieron agregados linfocíticos de pequeño tamaño. En algunos casos se evidenció la presencia de trombos.

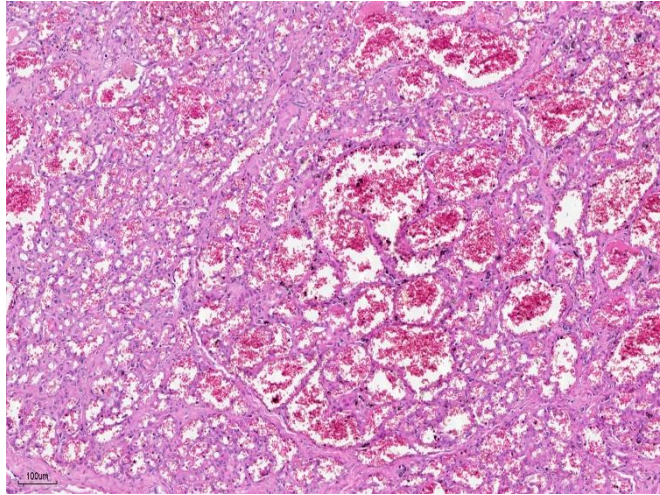


Fig. 2. Obsérvese en este preparado a mayor aumento el calibre de los vasos con contenido eritrocitario, estrechamente relacionados entre si. HE.

En el tipo cavernoso, los vasos sanguíneos neoplásicos fueron de tamaño variable, en su mayoría, grandes y estaban separados por importante cantidad de tejido conjuntivo fibroso (Figura 3A). El estroma presentaba reacción inflamatoria, caracterizada por abundancia de linfocitos, macrófagos, plasmocitos, mastocitos y siderófagos (células cargadas de hemosiderina) (Figura 3B). En algunos casos se observaron múltiples trombos, algunos de ellos organizados.

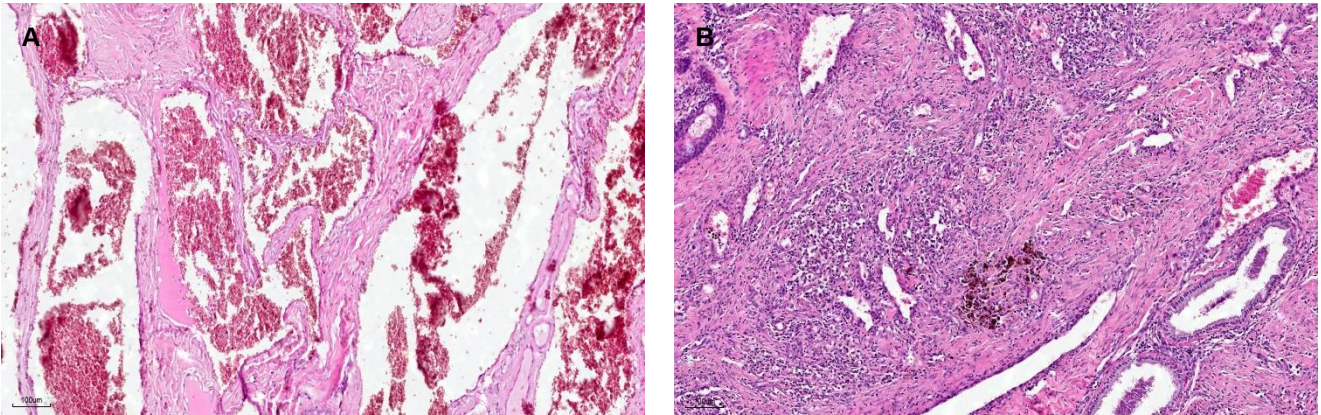


Fig. 3. **A:** Se evidencia gran cantidad de tejido conectivo separando canales vasculares de gran tamaño y con contenido eritrocitario. HE. **B:** Obsérvese un infiltrado inflamatorio severo y siderófagos en el estroma de un hemangioma cutáneo. HE.

En todos los casos de hemangioma capilar y cavernoso, los vasos sanguíneos estaban revestidos por una sola capa de células neoplásicas de tamaño y forma predominantemente uniforme y núcleos aplanados sin hiperchromasia (Figura 4). Las mitosis fueron raramente encontradas.

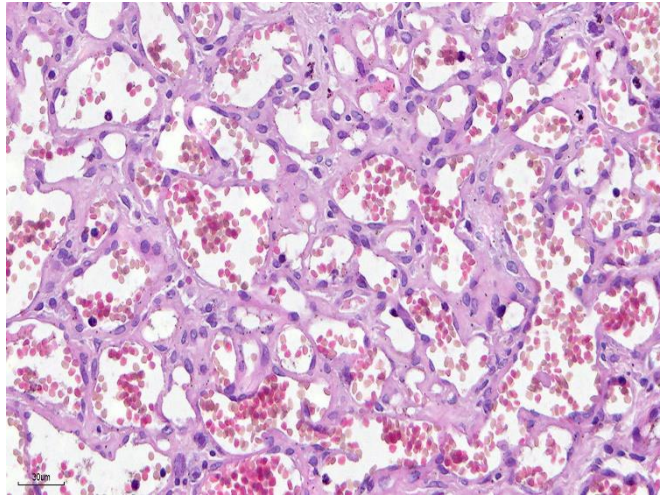


Fig. 4. Corte de hemangioma capilar donde se observa que la formación de vasos es a partir de una monocapa de células endoteliales monomórficas. HE.

En el tipo mixto, coexistieron el tipo capilar y el tipo cavernoso, pero en muchos casos el tipo cavernoso ocupó la zona dominante y el tipo capilar ocupó una localización más hacia la periferia del tumor (Figura 5).

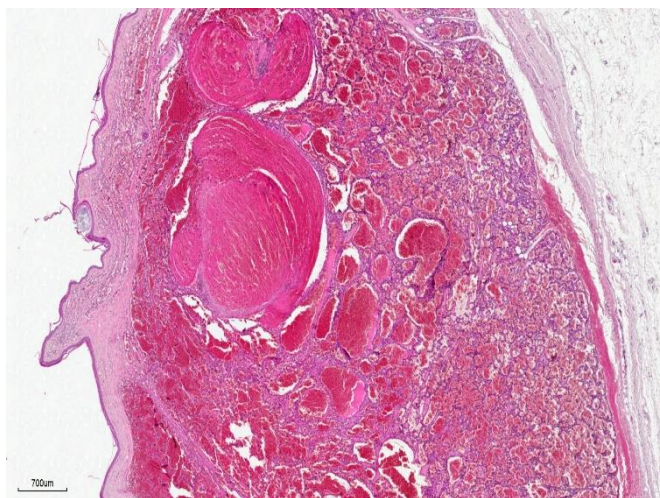


Fig. 5. Hemangioma cutáneo tipo mixto donde se visualiza una zona central predominantemente cavernosa, con presencia de trombos y una zona periférica ocupada por múltiples vasos sanguíneos de pequeño calibre. HE.

Independientemente del tipo de hemangioma, algunos tumores estaban rodeados de tejido conectivo delgado (Figura 5A). En un caso se detectó úlcera cutánea asociada al tumor, acompañada de granuloma, inflamación y necrosis (Figura 5B). En otro caso, un granuloma severo se observó acompañando la destrucción del tumor (Figura 5C).

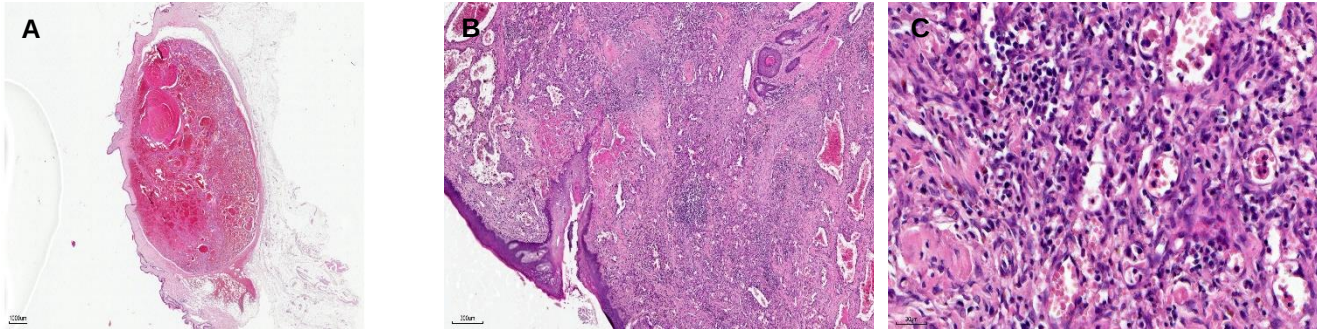


Figura 5 Se observan distintos cortes de hemangioma, a distintos aumentos y cada uno mostrando características singulares. **A:** Este hemangioma presenta una cápsula fibrosa característica de los tumores benignos. HE. **B:** Algunos hemangiomas presentan ulceraciones que dejan en evidencia un proceso necrótico e inflamatorio asociado. HE. **C:** Proceso inflamatorio severo a predominio linfoplasmocitario con intentos defensivos y de reparación frente a la agresión tumoral. HE.

Hemangiosarcomas

El examen microscópico evidenció los siguientes tipos tumorales: 1 hemangiosarcomas de tipo capilar (Figura 6A), y 1 de tipo epiteliode (Figura 6B) mientras que las muestras restantes eran de tipo mixto de cada tipo (el tipo mixto de capilar, cavernoso y sólido; y tipo mixto de cavernoso y sólido fueron los más frecuentemente observados) (Figura 6C y 6D). Los tumores se formaron desde la dermis hasta el tejido subcutáneo.

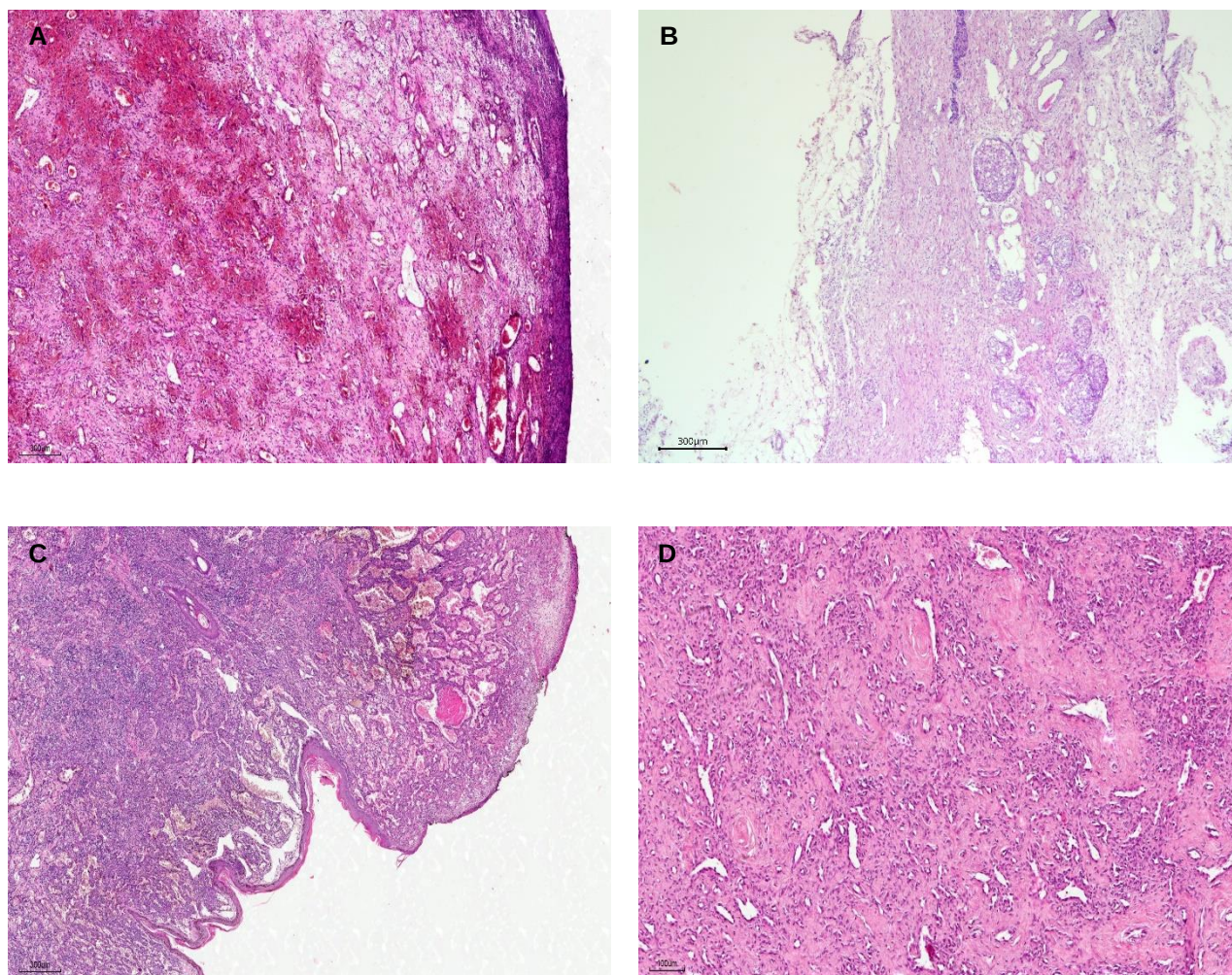


Fig. 6. Cortes de hemangiosarcomas cutáneos de distintos tipos histológicos. **A:** Hemangiosarcoma cutáneo tipo capilar, caracterizado por vasos de pequeño calibre. HE. **B:** Hemangiosarcoma cutáneo tipo epitelioides, caracterizado por células de apariencia “voluminosa” con escasa diferenciación. HE. **C:** Hemangiosarcoma cutáneo tipo mixto capilar, cavernoso y sólido. HE. **D:** Hemangiosarcoma cutáneo tipo mixto cavernoso y sólido. HE.

En todos los casos estudiados, los hemangiosarcomas no presentaban cápsula, eran infiltrantes (Figura 7A), o mal demarcados, o bien demarcados pero expansivos. Se detectó la presencia de úlceras en los tumores surgidos por debajo de la epidermis. En estos casos, la proliferación de las células neoplásicas, se acompañaba de áreas extensas de hemorragia y necrosis. Sólo en un caso el tumor no estaba rodeado por infiltrados pequeños de linfocitos, polimorfonucleares y macrófagos. En 18 casos del total se observó reacción desmoplásica acompañando el crecimiento tumoral (Figura 7B). Se observó la presencia de trombos en 8 de los 24 casos.

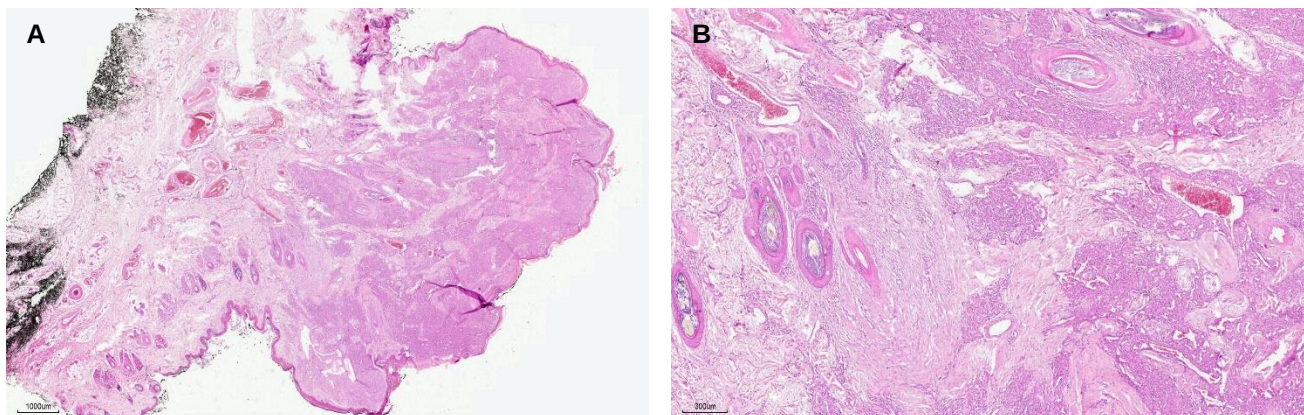


Fig. 7. **A:** Corte de hemangiosarcoma de tipo infiltrativo, característica propia de las neoplasias malignas. HE. **B:** Se observa proliferación de tejido conectivo asociado al crecimiento tumor en el tejido dérmico-epidérmico. HE.

En cuanto a la caracterización para su diagnóstico histopatológico, el de tipo capilar estaba compuesto por células endoteliales neoplásicas que formaban múltiples canales capilares de pequeño calibre, siendo predominantemente de forma redonda con contenido eritrocitario en su interior y separados por escaso o nulo tejido conectivo (Figura 8A). Las células neoplásicas presentaron citoplasma ahusado, eosinofílico claro y escasamente demarcado, los núcleos eran grandes, pleomórficos, redondeados e hipercromáticos a alargados o en forma de gota y con cromatina dispersa. Se evidenciaron abundantes siderófagos y otras poblaciones celulares infiltrantes como plasmocitos e histiocitos. El tipo cavernoso mostró vasos de mayor calibre, con formas y tamaños irregulares, constituidos por células endoteliales neoplásicas que recubrían y llenaban las trabéculas formadas entre las luces vasculares (Figura 8B). La cantidad de tejido conectivo en el estroma fue variable y se detectaron linfocitos, plasmocitos, histiocitos y siderófagos. En el tipo sólido, la proliferación neoplásica estaba compuesta por cordones sólidos de células neoplásicas inmaduras que conservaban la capacidad de formar canales vasculares (Figura 8C). Aunque rara vez se visualizaba una estructura vascular obvia, algunos vasos sanguíneos neoplásicos formados no presentaban eritrocitos en la luz y se parecían a una estructura alveolar. Éstos, se diagnosticaron como hemangiosarcomas de tipo epitelioides, se caracterizaban histológicamente por la presencia de células endoteliales neoplásicas de apariencia epitelial, y más voluminosas que las típicas células endoteliales tumorales descritas para los otros tipos tumorales ya descritos (Figura 8D). En parte este aumento de volumen se debe a la presencia de vacuolización intracitoplásmica (Figura 8E). Estas células tumorales constituyeron una angiogénesis leve y la formación de estructuras que recuerdan los ductos glandulares, así como aspecto similar al de los tumores sarcoides indiferenciados. Este tipo tumoral presentó tejido conectivo fibroso dispuesto en cordones entrelazados.

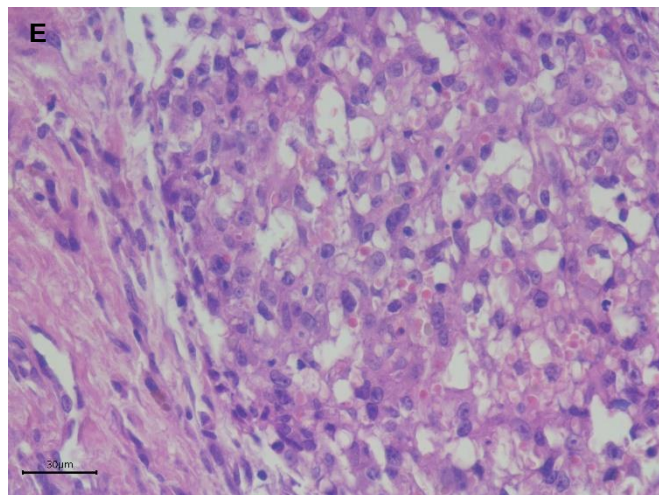
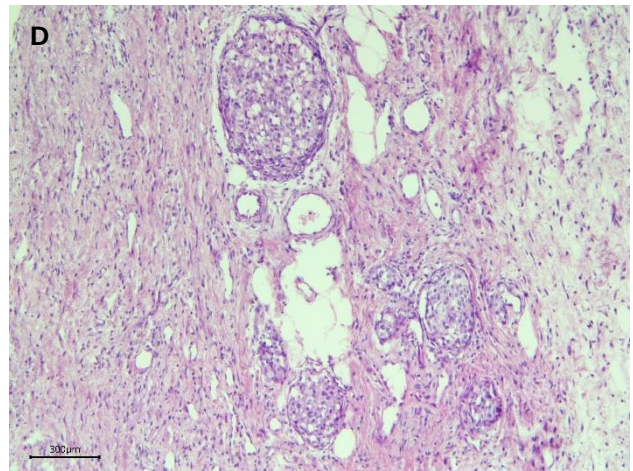
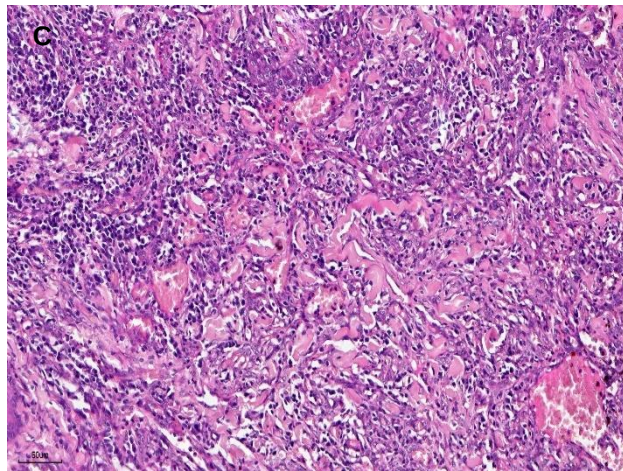
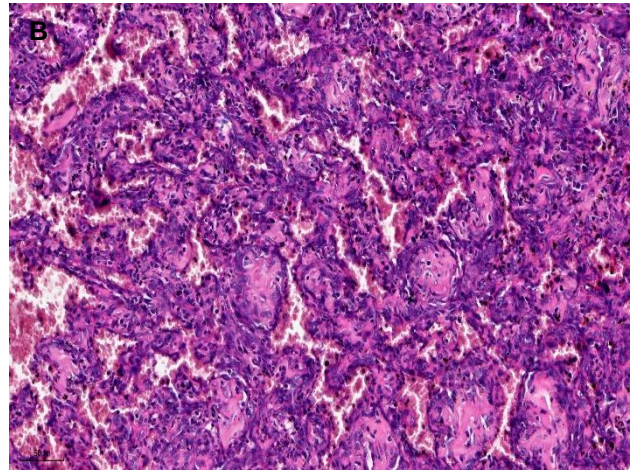
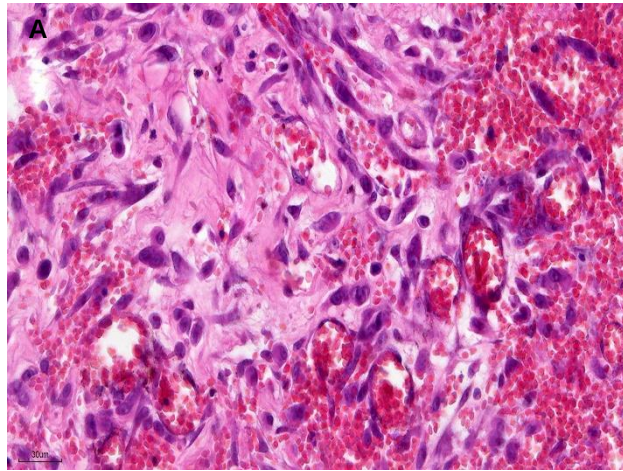


Fig. 8. Se visualizan las características histológicas de cada tipo de hemangiosarcoma. **A:** Hemangiosarcoma tipo capilar, compuesto por células pleomórficas formadoras de pequeños vasos estrechamente relacionados. HE. **B:** Hemangiosarcoma tipo cavernoso, compuesto por grandes canales separados por una generosa cantidad de tejido conectivo. HE. **C:** Hemangiosarcoma tipo

sólido, compuesto por células endoteliales extremadamente pleomórficas, unas pocas de ellas aún mantienen la capacidad de formar vasos sanguíneos. HE. **D:** Hemangiosarcoma epitelióide, conformado por células indiferenciadas cuyo aspecto asemeja un origen epitelial. HE. **E:** Se observan células correspondientes a un hemangiosarcoma epitelióide, de aspecto redondeado, con vacuolas intracitoplasmáticas en cuya luz se visualizan eritrocitos. HE.

Tricrómica de Masson

Hemangiomas

La tinción Tricrómica de Masson se empleó para la visualización histológica de fibras de tejido conectivo colágeno en secciones de tejido fijadas por formalina. Son tres los colorantes utilizados por esta técnica: hematoxilina férrica, que tiñe los núcleos de violeta, Fucsina ácida, que tiñe el citoplasma y las estructuras oxidadas en tonalidades de rojo y verde claro que evidencia las fibras colágenas en verde. Con esta técnica se observó que los hemangiomas de tipo capilar presentaron escaso a nulo tejido conectivo (colágeno tipo I) entre los pequeños capilares que lo conforman y el espacio extracelular (Figura 9).

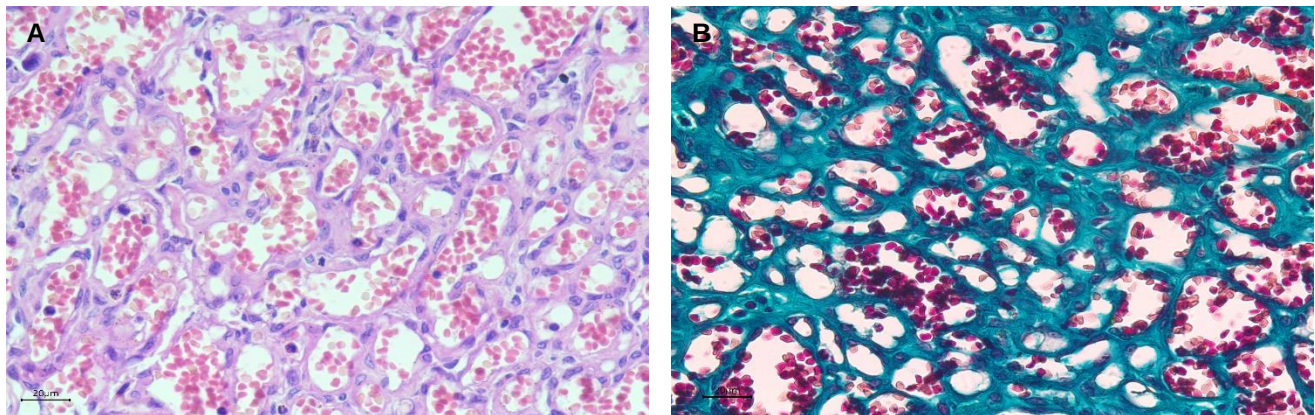


Fig. 9. Se observan dos cortes comparativos del mismo ejemplar de hemangioma tipo capilar. **A:** Hemangioma capilar teñido con la tinción de rutina diagnóstica. Se observa tejido conectivo teñido con eosina fuerte, los núcleos con hematoxilina y las estructuras oxidadas con eosina pálida, tono anaranjado. HE. **B:** Hemangioma capilar teñido con la tinción especial Tricrómica de Masson, donde se observan las diferentes estructuras celulares teñidas por los colorantes que componen la técnica. Evidencia escasa cantidad de tejido conectivo y una monocapa de células endoteliales. Tricrómica de Masson.

Los hemangiomas cavernosos presentan importantes cantidades de colágeno en las trabéculas conectivas que separan los grandes vasos (Figura 10).

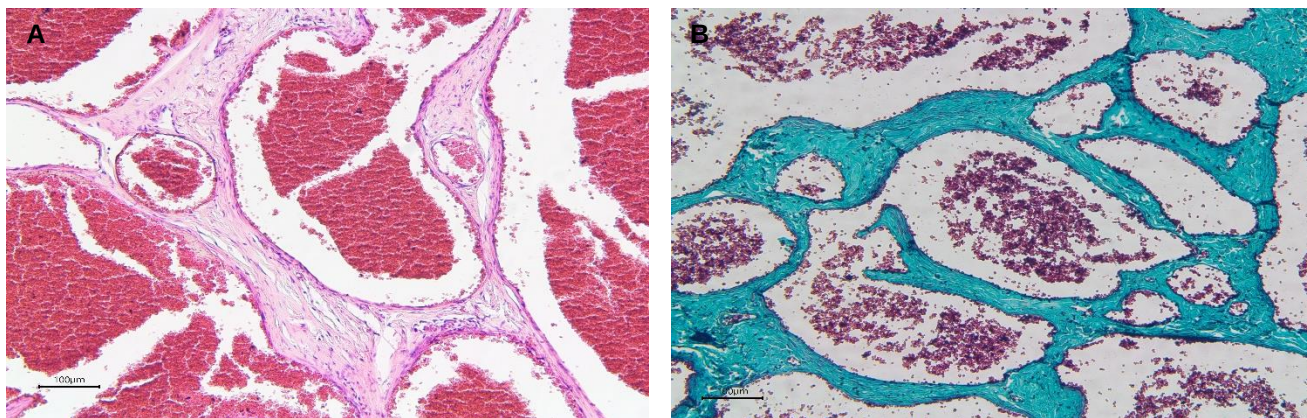


Fig. 10. Se observan dos cortes comparativos del mismo ejemplar de hemangioma tipo cavernoso. **A:** Tinción hematoxilina-eosina de rutina. HE. **B:** Tinción que evidencia mayor cantidad de tejido conectivo entre los espacios vasculares. Tricrómica de Masson.

Los hemangiomas de tipo mixto evidencian una zona central compuesta por vasos sanguíneos de gran calibre llenos de eritrocitos y separados por gruesas trabéculas de tejido conectivo, mientras que en la zona periférica del tumor predominan los de pequeño calibre con escaso a nulo tejido estromal (Figura 11).

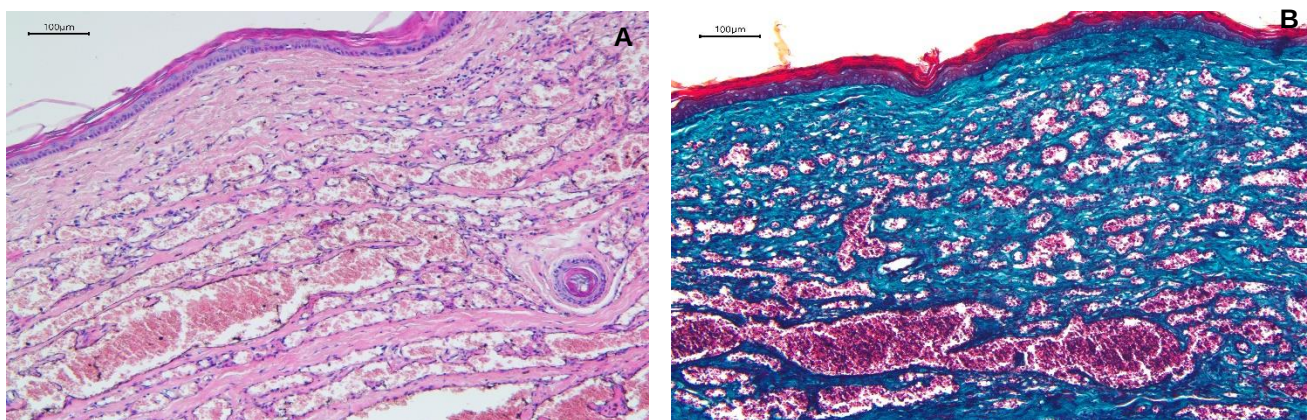


Fig. 11. Se observan dos cortes comparativos del mismo ejemplar de hemangioma tipo mixto. **A:** Tinción hematoxilina-eosina de rutina. HE. **B:** Tinción que evidencia tejido conectivo compacto entre los espacios vasculares de la zona central el tumor y menor cantidad en la zona periférica, entre los vasos de pequeño calibre. Tricrómica de Masson.

Hemangiosarcomas

Respecto a la morfología microscópica de los hemangiosarcomas capilares y cavernosos coincide con la de los hemangiomas en lo que respecta a la presencia de colágeno evidenciada con la técnica tricrómica. En este caso las fibras se encuentran en forma más desorganizada y en pequeñas islas u ovillos. Los hemangiosarcomas sólidos mostraron una disposición más difusa y homogénea de escaso tejido colágeno, muchas veces distribuido en forma arborescente entre los capilares neoplásicos (Figura 12). El tipo epiteliode presentó una matriz de escaso tejido conectivo, desordenado y suelto, dispuesto entre los vasos sanguíneos patológicos, sin formación de trabéculas.

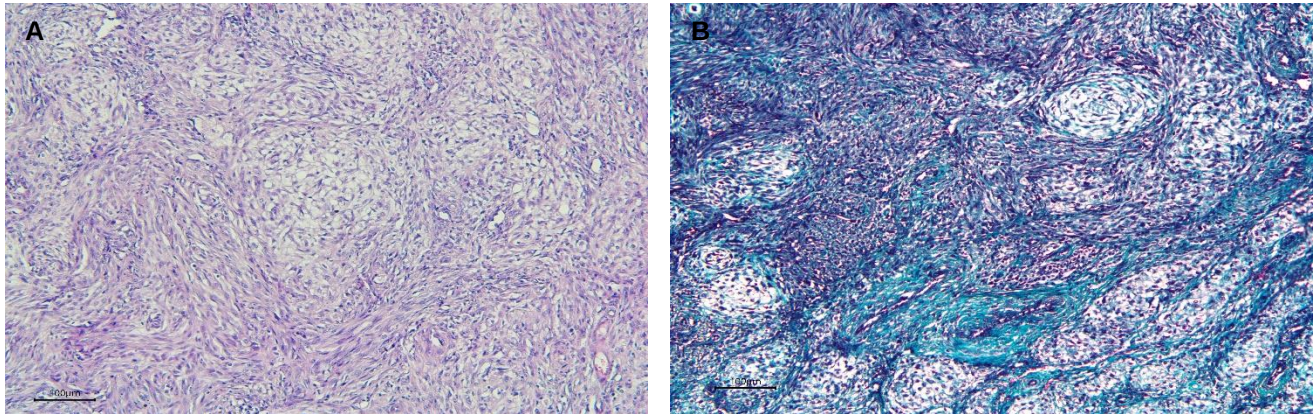


Fig. 12. Se observan dos cortes comparativos del mismo ejemplar de hemangiosarcoma de tipo sólido. **A:** Tinción hematoxilina-eosina de rutina. Donde se evidencia escaso tejido conectivo y vasos sanguíneos escasos y aislados. HE. **B:** Tinción que evidencia escaso tejido conectivo dispuesto alrededor de los escasos vasos sanguíneos formando estructuras arborescentes. Tricrómica de Masson.

5.3. INMUNOHISTOQUÍMICA

Todas las muestras de hemangiomas y hemangiosarcomas presentaron marcación inmunohistoquímica para el antígeno relacionado con CD31 y factor VIII. La localización celular específica para factor VIII fue citoplasmática fuerte y membranosa extremadamente fuerte, el tipo de marcación fue granular y la intensidad fue elevada (Figura 13). Se evidenció marcación de fondo inespecífica para este anticuerpo en las muestras de hemangiomas y hemangiosarcomas.

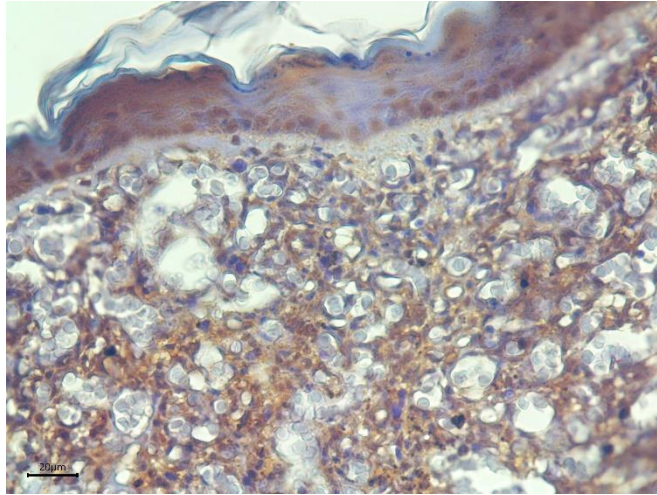


Fig. 13. Se evidencia un hemangiosarcoma de tipo capilar con marcación inmunohistoquímica para el antígeno relacionado con factor VIII caracterizada por ser específica, fuerte, difusa, granular e intracitoplasmática. IHQ contra factor VIII.

La marcación con el antígeno relacionado con CD31 se localizó preferentemente y casi exclusivamente en la membrana citoplasmática de las células endoteliales, siendo altamente intensa y de tipo homogénea y no granular (Figura 14). Este anticuerpo presentó baja a nula marcación inespecífica.

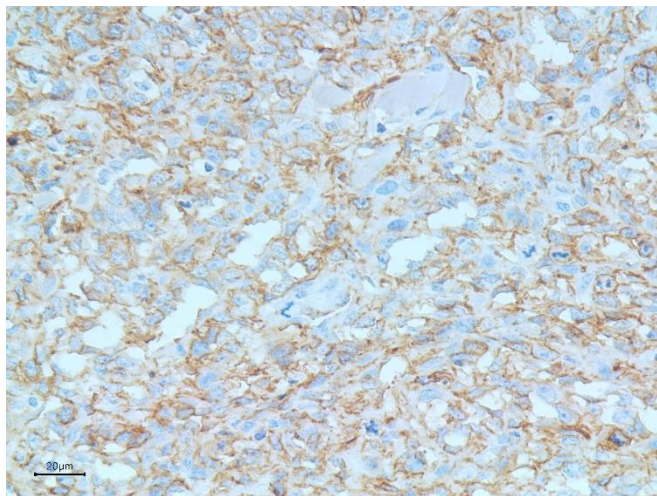


Fig. 14. Se observa un hemangiosarcoma de tipo capilar con marcación inmunohistoquímica para el antígeno relacionado con CD31 caracterizada por ser muy específica, fuerte, no granular y membranosa, con nula marcación inespecífica. IHQ contra CD31.

Tanto las marcaciones contra CD31, como contra factor VIII presentaron menos intensidad en el hemangiosarcoma de tipo epitelióide (Figura 15).

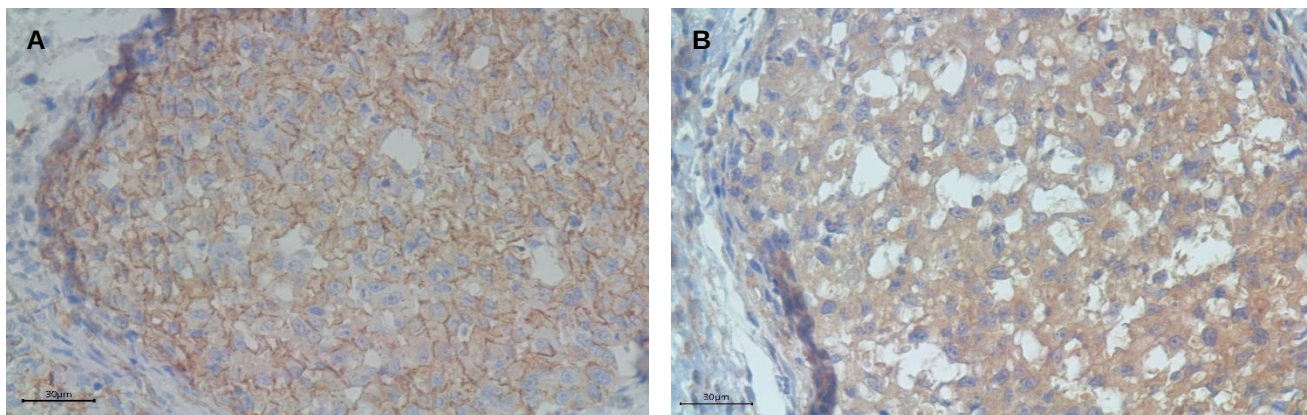


Fig. 15. Cortes seriados del mismo espécimen histológico de hemangiosarcoma epitelioides. **A:** Hemangiosarcoma epitelioides con una débil marcación inmunohistoquímica para el antígeno relacionado con CD31. IHQ contra CD31. **B:** Hemangiosarcoma epitelioides con una débil y difusa marcación inmunohistoquímica para el antígeno relacionado con Factor VIII. IHQ contra factor VIII.

Sin embargo, las células tumorales en cuestión fueron negativas para CD34 en todos los tipos tumorales (Figura 16).

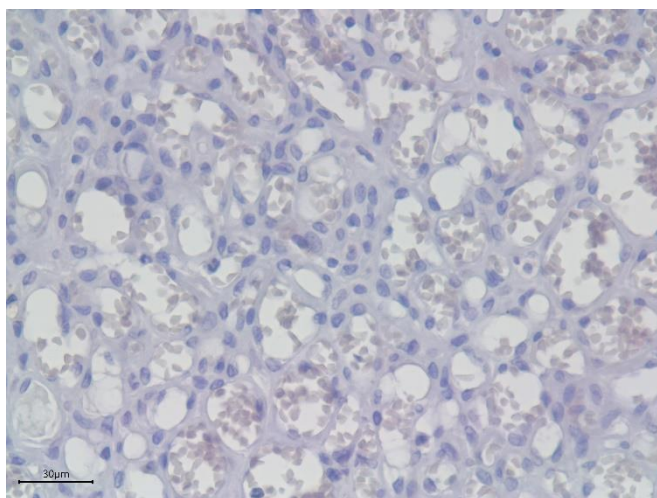


Fig. 16. Corte de un hemangioma capilar con nula marcación inmunohistoquímica para el antígeno relacionado con CD34. IHQ contra CD34.

Tabla 1. Datos clínicos e histológicos de caninos con hemangiomas

Items	Caninos (%)
Razas (n = 25)	
Cruza	11 (44)
Pastor Alemán	3 (12)
Boxer	2 (8)
Cocker Spaniel	2 (8)
Sharpei	2 (8)
Pitbull Terrier	1 (4)
Otros	4 (16)
Sexo (n = 25)	
Macho	13 (52)
Hembra	12 (48)
Localización (n = 25)	
Extremidades	10 (40)
Tronco	9 (36)
Cuello	3 (12)
Sin información	3 (12)
Sitio histológico (n = 25)	
Dermis	24 (86)
Subcutis	1 (4)
Tipo histológico (n = 25)	
Tipo mixto capilar y cavernoso	23 (92)
Tipo capilar	1 (4)
Tipo cavernoso	1 (4)

Tabla 2. Datos clínicos e histológicos de los caninos con hemangiosarcomas

Items	Caninos (%)
Razas (n = 24)	
Cruza	10 (42)
Pitbull Terrier	3 (13)
Labrador Retriever	2 (8)
Boxer	2 (8)
Otros	7 (29)
Sexo (n = 24)	
Macho	10 (42)
Hembra	14 (58)
Localización (n = 24)	
Tronco	12 (50)
Extremidades	8 (34)
Escroto	2 (8)
Labio	1 (4)
Sin información	1 (4)
Tipo histológico (n = 24)	
Tipo mixto capilar, cavernoso y sólido	9 (39)
Tipo mixto cavernoso y sólido	6 (25)
Tipo mixto capilar, cavernoso, sólido y epitelioides	2 (8)
Tipo mixto sólido y epitelioides	2 (8)
Tipo mixto capilar, sólido y epitelioides	2 (8)
Tipo mixto cavernoso, sólido y epitelioides	1 (4)
Tipo capilar	1 (4)
Tipo epitelioides	1 (4)

6. DISCUSIÓN

Se ha informado que la edad media de los caninos con hemangiomas cutáneos era superior a 8 años (Hargis et al. 1992; van der Gaag et al. 1989). Los caninos con diagnóstico de hemangioma cutáneo en este estudio mostraron que la edad promedio en el momento de la escisión era de 8.36 ± 2.08 años, por lo tanto, no hubo diferencias en la edad promedio de los casos respecto a los reportados en informes anteriores. Por otro lado, existen reportes de casos de desarrollo de estas neoplasias al nacer y durante los primeros años de vida, lo que sugiere como origen una malformación vascular congénita o hemangiomatosis (Hargis et al. 1992). Considerando que los perros involucrados en esta investigación superaban los 5 años de edad, esto no parece indicar que los hemangiomas tuvieran su origen en malformaciones congénitas.

Por otra parte, también se ha propuesto que no existen diferencias de género, e incluso que las hembras presentan con mayor frecuencia hemangiomas que los machos (Hargis et al. 1992; van der Gaag et al. 1989). En este estudio no se detectó mayor frecuencia de aparición vinculada al género. Como una de las causas de hemangiomas dérmicos se ha planteado el daño solar crónico (Hendrick 2017; Mauldin & Peters-Kennedy 2016; Hargis et al. 1992). Además, se informó que los perros con pelaje corto y piel ligeramente pigmentada tienen más hemangiomas y hemangiosarcomas que los perros con pelaje de longitud variable y pigmentación (Clifford et al. 2000; Hargis et al. 1992). En nuestros casos, los hemangiomas y hemangiosarcomas diagnosticados también se detectaron en perros de pelo largo y en múltiples razas. Por lo tanto, en nuestro estudio, no se contempló la relación entre los tumores vasculares de la piel y la exposición a la luz ultravioleta planteada por otros autores. Así mismo existen reportes que plantean que no está claro el origen de los hemangiosarcomas cutáneos no actínicos, y que es poco probable que la radiación solar incida en su desarrollo, siendo la etiopatogenia similar a la de los hemangiosarcomas viscerales (De Nardi et al 2023). Sin embargo, resultó interesante que los hemangiomas se encontraran por debajo de la epidermis en 8 de los 25 caninos de este estudio reconsiderando la relación entre este tipo tumoral y el daño solar. Para encontrar una relación positiva entre las razas de perros y la exposición solar, sería necesaria una investigación epidemiológica más completa y con mayor número de casos. Los cambios morfológicos presentes en los hemangiomas fueron similares a los informados previamente (Lather et al 2014; Hargis et al 1992; van der Gaag et al 1989). En este estudio, la formación de múltiples trombos organizados se consideró como uno de los cambios característicos. La gran cantidad de trombos puede estar relacionada con el flujo de sangre en el tumor y el transcurso del tiempo desde la formación del tumor. El presente estudio también mostró que el tipo mixto fue el más común, coincidiendo con otros autores (Hargis et al. 1992). Dependiendo del tiempo de evolución del tumor y la condición de los caninos, los hemangiomas pueden evolucionar desde los del tipo capilar a los del tipo cavernoso con la proliferación de tejido conectivo. Estudios inmunohistoquímicos previos informan que la tinción con factor VIII es la más sensible para el diagnóstico de los hemangiomas caninos (von Beust et al. 1988) y que el marcador CD31 tiene una relevancia diagnóstica limitada para las

neoplasias vasculares de los gatos (Jennings et al. 2012). En nuestros casos, las células tumorales fueron reactivas contra ambos anticuerpos primarios (CD31 y factor VIII). En caninos, varios autores postulan que el hemangiosarcoma es una neoplasia que metastatiza fácilmente a órganos distantes por vía hematógena (Carloni et al. 2019; Nóbrega et al. 2019; Hendrick 2017; Mauldin & Peters- Kennedy 2016; Guinan et al. 2012; Shor et al. 2009). En cambio, para los felinos, algunos estudios sugieren que el origen de estas células endoteliales tumorales deriva de células madre (Griffin et al. 2012; Tinsley 2020). Para los caninos, el principal sitio primario de desarrollo de hemangiosarcomas es el bazo, aunque también se observan en otros órganos, incluidos el corazón y la piel (Iwata et al. 2018; Leyva et al 2018; Hendrick 2017; Spranger & Kazz 1997; Mauldin & Peters- Kennedy 2016; Burchell et al 2014; Yamamoto et al 2013; Guinan et al. 2012; Clifford 2000; Sprangler & Kazz 1997; Sprangler & Culbertson 1992; van der Gaag et al. 1989; Aronsohn 1985; Brown et al. 1985). Para el caso de los hemangiosarcomas cutáneos caninos, estos representan aproximadamente el 13% de todos los hemangiosarcomas en perros (Tinsley 2020). En nuestro estudio, la frecuencia de diagnóstico de hemangiosarcomas cutáneos en relación con los hemangiosarcomas viscerales y no viscerales diagnosticados en nuestro laboratorio fue de 89%, y esta incidencia fue bastante alta en comparación con informes anteriores (Mullin et al. 2019; Gruntzig et al. 2016; Young et al. 2010). Sin embargo, datos epidemiológicos brasileños demuestran que la incidencia de hemangiosarcoma cutáneo canino fue del 27 al 80% respecto a la totalidad de hemangiosarcomas viscerales y no viscerales (de Nardi et al. 2023). Además, Hargis et al. (1992) informan que la incidencia de hemangiomas es más alta que la de hemangiosarcomas y que algunos caninos tienen una combinación de hemangiomas y hemangiosarcomas.

En nuestro estudio, los hemangiomas fueron del 5,8% y los hemangiosarcomas del 5.3%, por lo que no hubo diferencia en la incidencia de ambos tumores. Además, ningún canino presentó hemangiomas y hemangiosarcomas concurrentes. Aunque se dice que este tumor es más frecuente en algunas razas como Pastor Alemán, Golder Retriever, Labrador Retriever y Shnauzer (Clifford et al. 2000), los hemangiosarcomas de nuestro trabajo mayoritariamente afectaron a perros cruza (que constituyen la amplia mayoría de la población canina uruguaya) y estaban presente en alguna pocas razas específicas (dato que puede estar influido por la tendencia a la cría de determinadas razas en un momento particular, al intentar identificar algunas de las razas caninas con prediposición al desarrollo de estos tumores. Por lo que debería complementarse el estudio histopatológico con análisis poblacionales más amplios. Algunos informes indican una mayor prevalencia en los machos (Gruntzig et al. 2016; Clifford et al. 2000), en nuestro estudio no hubo diferencia en la frecuencia de aparición por sexo. El hemangiosarcoma ocurre en perros mayores y la edad promedio de los perros afectados en el momento del diagnóstico es de 8 a 13 años (Clifford et al. 2000; Prymak et al. 1998; Srebernik et al. 1991; Sprangler et al. 1992; Brown et al. 1985). La edad promedio de los caninos con hemangiosarcomas en el período estudiado en este trabajo fue de 8.7 ± 2.5 años, pero 9 perros del total de 24 tenían 8 años o menos, tomando de referencia la edad en que la muestra de biopsia de piel había sido remitida a nuestro laboratorio. Es claro que el desarrollo del tumor se debió iniciar, al menos en la mayoría de los casos estudiados, antes que cuando se decidió

y realizó la cirugía y se remitió la muestra para su estudio histopatológico. Considerando esto, los hemangiosarcomas cutáneos caninos en Uruguay pueden ocurrir, antes de lo descrito en este trabajo, y muy probablemente, con mayor frecuencia en caninos más jóvenes. Es por ello que, para tener una información más certera de la aparición temprana de los tumores vasculares cutáneos caninos, es necesaria la realización de estudios epidemiológicos más amplios, incluyendo más datos clínicos que describan precisamente el tiempo de evolución, para intentar un diagnóstico temprano, requiriéndose también una mayor investigación utilizando mayor número de materiales de los reportados en este trabajo.

En este estudio, intentamos aclarar la relación entre los tipos tumorales y el pronóstico clínico futuro después de la cirugía de extracción de tumor, fue por ello que clasificamos los hemangiosarcomas diagnosticados en cuatro tipos histológicos, capilar, cavernoso, sólido, epitelioides y mixto según la diferenciación de células tumorales y basados en la literatura publicada (Valli et al. 2017; Kim et al. 2015; Gorden et al 2014; Dickerson et al 2005). Dadas las características histopatológicas de indiferenciación celular, invasividad y capacidad de infiltración, consideramos al tipo epitelioides como el de mayor malignidad de todos los tipos diagnosticados. Como resultado de la clasificación el tipo mixto que incluye el tipo capilar, cavernoso y sólido y el tipo mixto de cavernoso y sólido fueron los más frecuentemente observados. Hasta donde sabemos, la incidencia de cada tipo de hemangiosarcoma no ha sido bien determinada previamente. Además, obtuvimos interesantes y novedosos resultados, ya que las células tumorales epitelioides se detectaron en 7 tipos mixtos y también se observó un caso de hemangiosarcoma formado sólo por células tumorales epitelioides. Warren y Summers (2007) informaron que las características histológicas claves en el hemangiosarcoma epitelioides eran la apariencia epitelioides de las células endoteliales neoplásicas y la vacuolización ocasional de su citoplasma y Shor et al. (2009) mencionan que uno de los hallazgos característicos era la formación de nidos discretos de células tumorales similares a las vistas en preparados histológicos de carcinomas anaplásicos. En nuestro estudio, el hemangiosarcoma de tipo epitelioides mostró cambios histológicos similares a los descritos previamente por otros autores, y las células tumorales fueron positivas para marcadores endoteliales, como el factor VIII y CD31 descritos por Warren y Summers (2007). Según el informe de Shor et al. (2009) el hemangiosarcoma epitelioides hace metástasis a varios órganos como próstata, pulmón, hígado, riñón, testículos, colon, estómago y cerebro y se considera un tipo con alta malignidad.

Los resultados inmunohistoquímicos revelaron que las células tumorales de varios tipos de hemangiomas reaccionaron con factor VIII y CD31. Sin embargo, las células tumorales fueron negativas para CD34. Se dice que la inmunopositividad del factor VIII se considera diagnóstica para hemangiosarcomas y se ha demostrado que CD31 solo o combinado con factor VIII es más específico y necesario en casos de hemangiosarcomas epitelioides (Hendrick, 2017). Nuestros datos confirman los resultados reportados por estos autores. Además, hay numerosos informes sobre la utilidad de la combinación de factor VIII y CD31 en el diagnóstico inmunohistoquímico de hemangiosarcomas, incluyendo al de tipo epitelioides (Choi, 2019;

Ramos-Vara et al. 2018, Tsuji et al. 2013; Guinan et al. 2012; Jennings et al. 2012; Warren y Summers 2007; von Beust et al. 1988). Aunque también se ha dicho que CD34 es útil como marcador para el diagnóstico inmunohistoquímico de hemangiosarcomas, se dice que la falta de especificidad limita su uso para confirmar tumores vasculares en caninos, y la amplia expresión de CD34 en neoplasias de gatos, tampoco justifica su uso como marcador de neoplasias vasculares en esa especie (Hendrick, 2017; Jennings et al. 2012). En este sentido, se dice que la inmunohistoquímica de CD31 para el diagnóstico en neoplasias vasculares pobremente diferenciadas o epitelioides en caninos requiere especial atención dada la posible reactividad cruzada (Ramos- Vara et al. 2018).

7. CONCLUSIÓN

La edad promedio de los perros que presentaban hemangiomas en el momento de la escisión quirúrgica fue de 8,4 años y la de los perros con hemangiosarcomas fue de 8,7 años.

No se detectó predilección por el sexo en perros con hemangiomas y hemangiosarcomas.

Ambos afectaron varias razas de perros, pero dada la preponderancia de animales cruzados, estos fueron los mayoritariamente diagnosticados para ambos tumores vasculares.

Los hemangiomas en este estudio se clasificaron en 3 tipos, capilar, cavernoso y mixto y el tipo mixto fue más frecuente que los tipos capilar y cavernoso.

Los hemangiosarcomas se clasificaron en los tipos capilar, cavernoso, sólido, epitelioides y tipo mixto en base a la indiferenciación de las células endoteliales neoplásicas. Como resultado de esta clasificación, se observó con frecuencia el tipo mixto (capilar, cavernoso y sólido) y el tipo mixto (cavernoso y sólido), el tipo epitelioides se observó en 7 tipos mixtos y en un caso formado únicamente por células tumorales de aspecto epitelioides.

Los tumores vasculares, y sobre todo los hemangiosarcomas cutáneos en caninos, son de alta frecuencia de aparición en Uruguay, y por ser enfermedades de etiopatogenia compleja, es difícil de dilucidar su etiología usando solamente la histopatología convencional. A la fecha, hay un número reducido de marcadores disponibles para definir su pronóstico, así como de opciones terapéuticas, por lo que nuestro trabajo confirma que el uso complementario de la inmunohistoquímica contra factor VIII y CD31 pueden ser herramientas complementarias útiles para su estudio sistemático.

Este trabajo de caracterización epidemiológica e histopatológica en nuestro país contribuye al entendimiento del comportamiento biológico de dichos tumores y la estandarización entre informes histopatológicos, que permitan en el futuro, la realización de nuevos estudios clínicos con criterios más homogéneos y la obtención de información valiosa para establecer su pronóstico post-quirúrgico.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Antonescu, C. (2014). Malignant vascular tumors—an update. *Modern Pathology*, 27, S30-S38.
2. Aronsohn, M. (1985). Cardiac hemangiosarcoma in the dog: a review of 38 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187, 922-926.
3. Bertazzolo, W., Dell'Orco, M., Bonfanti, U., Ghisleni, G., Caniatti, M., Masserdotti, C., & Roccabianca, P. (2005). Canine angiosarcoma: cytologic, histologic, and immunohistochemical correlations. *Veterinary Clinical Pathology*, 34, 28-34.
4. Bildfell, R. J., Valentine, B. A., & Whitney, K. M. (2002). Cutaneous vasoproliferative lesions in goats. *Veterinary pathology*, 39, 273-277.
5. Bolfa, P., DellaGrotte, L., Weronko, T., & Armien, A. G. (2018). Cutaneous epithelioid hemangiosarcoma with granular cell differentiation in a dog: a case report and review of the literature. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30, 951-954.
6. Brown N. O., Patnaik A. K., & MacEwen E. G. (1985). Canine hemangiosarcoma: retrospective analysis of 104 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 186, 56-58.
7. Bulakowski, E. J., Philibert, J. C., Siegel, S., Clifford, C. A., Risbon, R., Zivin, K., & Cronin, K. L. (2008). Evaluation of outcome associated with subcutaneous and intramuscular hemangiosarcoma treated with adjuvant doxorubicin in dogs: 21 cases (2001–2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233, 122-128.
8. Burchell, R. K., Kirberger, R. M., & Janse van Rensburg, D. D. (2014). Haemangiosarcoma of the os penis in a dog: The most common neoplasm of the canine penis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 85, 1-4.
9. Burton, J. H., Powers, B. E., & Biller, B. J. (2014). Clinical outcome in 20 cases of lingual hemangiosarcoma in dogs: 1996–2011. *Veterinary and Comparative Oncology*, 12, 198-204.

10. Carloni A., Terragni R., Morselli-Labate A. M., et al. (2019). Prevalence, distribution, and clinical characteristics of hemangiosarcoma-associated skeletal muscle metastases in 61 dogs: A whole body computed tomographic study., 33, 812-819.
11. Clifford, C. A., Mackin, A. J., & Henry, C. J. (2000). Treatment of canine hemangiosarcoma: 2000 and beyond. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14, 479-485.
12. Della Santa, D., Dandrieux, J., Psalla, D., Gorgas, D., Lang, J., Geissbühler, U., & Howard, J. (2008). Primary prostatic haemangiosarcoma causing severe haematuria in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, 49, 249-251.
13. De Nardi A. B., Gomes C. O. M. S., Fonseca-Alves C.E., et al. (2023). Diagnosis, prognosis, and treatment of canine hemangiosarcoma: A review based on a consensus organized by the *Brazilian Association of Veterinary Oncology, ABROVET*, 15, 2025.
14. Fernández, S., Lang, J. M., & Maritato, K. C. (2019). Evaluation of nodular splenic lesions in 370 small-breed dogs (< 15 kg). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 55, 201-209.
15. Fukuda, S., Kobayashi, T., Robertson, I. D., Oshima, F., Fukazawa, E., Nakano, Y., & Thrall, D. E. (2014). Computed tomographic features of canine nonparenchymal hemangiosarcoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 55, 374-379.
16. Gorden, B. H., Kim, J. H., Sarver, A. L., Frantz, A. M., Breen, M., Lindblad-Toh, K., 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, 985-995.

17. Griffin, M. A., Culp, W. T., & Rebhun, R. B. (2018). Lower urinary tract neoplasia. *Veterinary Sciences*, 5, 96.
18. Grüntzig, K., Graf, R., Boo, G., Guscetti, F., Hässig, M., Axhausen, K. W., & Pospischil, A. (2016). Swiss canine cancer registry 1955–2008: occurrence of the most common tumour diagnoses and influence of age, breed, body size, sex and neutering status on tumour development. *Journal of Comparative Pathology*, 155, 156-170.
19. Guinan, J., Fischetti, A., Garate, A. P., & Chalhoub, S. (2012). Primary peri-aortic hemangiosarcoma in a dog. *The Canadian Veterinary Journal*, 53, 1214.
20. Hammer, A. S., Couto, C. G., Filppi, J., Getzy, D., & Shank, K. (1991). Efficacy and toxicity of VAC chemotherapy (vincristine, doxorubicin, and cyclophosphamide) in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5, 160-166.
21. Hargis, A. M., Ihrke, P. J., Spangler, W. L., & Stannard, A. A. (1992). A retrospective clinicopathologic study of 212 dogs with cutaneous hemangiomas and hemangiosarcomas. *Veterinary Pathology*, 29, 316-328.
22. Hendrick, M. J. (2017). Mesenchymal tumors of the skin and soft tissues. En D.J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (5^a ed.pp. 142-175). Ames, Iowa: Wiley Blackwell.
23. Iwata, M., Aikawa, T., Miyazaki, Y., & Sadahiro, S. (2018). Primary colonic hemangiosarcoma in a dog. *The Canadian Veterinary Journal*, 59, 373.
24. Jennings, R. N., Miller, M. A., & Ramos-Vara, J. A. (2012). Comparison of CD34, CD31, and factor VIII–related antigen immunohistochemical expression in feline vascular neoplasms and CD34 expression in feline nonvascular neoplasms. *Veterinary Pathology*, 49, 532-537.

25. Kim, J. H., Graef, A. J., Dickerson, E. B., & Modiano, J. F. (2015). Pathobiology of hemangiosarcoma in dogs: research advances and future perspectives. *Veterinary Sciences*, 2, 388-405.
26. Ko, J. S., & Billings, S. D. (2015). Diagnostically challenging epithelioid vascular tumors. *Surgical Pathology Clinics*, 8, 331-351.
27. 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, 870-878.
28. Lather D., Nehra V., Gupta R.P., et al. (2014). Cutaneous haemangioma in a dog-a case report. *The Haryana Veterinarian*, 54, 89-90.
29. Leyva, F. J., Loughin, C. A., Dewey, C. W., Marino, D. J., Akerman, M., & Lesser, M. L. (2018). Histopathologic characteristics of biopsies from dogs undergoing surgery with concurrent gross splenic and hepatic masses: 125 cases (2012–2016). *BMC Research Notes*, 11, 1-5.
30. Liptak, J. M., Dernell, W. S., Withrow, S. J. (2004). Haemangiosarcoma of the urinary bladder in a dog. *Australian Veterinary Journal*, 82, 215-217.
31. Mansfield, S. A., Williams, R. F., & Iacobas, I. (2020, October). Vascular tumors. *Seminars in Pediatric Surgery*, 29(5),150975.
32. Marolf, A., Specht, A., Thompson, M., & Castleman, W. (2006). Imaging diagnosis: Penile hemangiosarcoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 47, 474-475.
33. Mauldin, E. A., & Peters-Kennedy, J. (2016). Integumentary system. En M. Grant Maxie (Ed.), *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals (6^a ed.pp. Volume 1*, 509-802.

34. Miettinen, M., Lindenmayer, A. E., & Chaubal, A. (1994). Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H-and Y-antigens--evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Modern Pathology*, 7, 82-90.
35. Miller, M. A., Ramos, J. A., & Kreeger, J. M. (1992). Cutaneous vascular neoplasia in 15 cats: clinical, morphologic, and immunohistochemical studies. *Veterinary Pathology*, 29, 329-336.
36. Mullin, C., & Clifford, C. A. (2019). Histiocytic sarcoma and hemangiosarcoma update. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 49, 855-879.
37. Nikula, K. J., Benjamin, S. A., Angleton, G. M., Saunders, W. J., & Lee, A. C. (1992). Ultraviolet radiation, solar dermatosis, and cutaneous neoplasia in beagle dogs. *Radiation Research*, 129, 11-18.
38. Nóbrega, D. F., Sehaber, V. F., Madureira, R., & Bracarense, A. P. F. R. L. (2019). Canine cutaneous haemangiosarcoma: Biomarkers and survival. *Journal of Comparative Pathology*, 166, 87-96.
39. Oksanen, A. (1978). Haemangiosarcoma in dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 88, 585-595.
40. Osuga, T., Nakamura, K., Morita, T., Kagawa, Y., Ohta, H., & Takiguchi, M. (2017). Diastolic heart failure associated with hemangiosarcoma infiltrating left ventricular walls in a dog. *The Canadian Veterinary Journal*, 58, 1167.
41. Paek, M., Glass, E., Kent, M., Clifford, C. A., & de Lahunta, A. (2015). Primary lumbar extradural hemangiosarcoma in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 51, 191-196.

42. Pharr, J. W., Holmberg, D. L., & Clark, E. G. (1992). Hemangiosarcoma in the main pulmonary artery of a dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 33, 78-82.
43. Priestnall, S. L., De Bellis, F., Bond, R., Alony-Gilboa, Y., & Summers, B. A. (2010). Spontaneous regression of congenital cutaneous hemangiomas in a calf. *Veterinary Pathology*, 47, 343-345.
44. Prymak, C., McKee, L. J., Goldschmidt, M. H., et al. (1998). Epidemiologic, clinical, pathologic, and prognostic characteristics of splenic hemangiosarcoma and splenic hematoma in dogs: 217 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193, 706-712.
45. Rouhani, P., Fletcher, C.D., Devesa, S. S. & Toro, J. R. (2008). Cutaneous soft tissue sarcoma incidence patterns in the U.S.: an analysis of 12,114 cases. *Cancer*, 113, 616–27
46. Sabattini, S., & Bettini, G. (2009). An immunohistochemical analysis of canine haemangioma and haemangiosarcoma. *Journal of Comparative Pathology*, 140, 158-168.
47. Santos, I. R., Lima, A. C., Ferreira, H. H., Rezende, B. R., Silva, A. R., Santos, A. S. (2020). Canine cutaneous neoplasms in the metropolitan region of Goiânia, Goiás state, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 40, 614-620.
48. Schultheiss, P. C. (2004). A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16, 522-526.
49. Shiu, K. B., Flory, A. B., Anderson, C. L., Wypij, J., Saba, C., Wilson, H., & Chun, R. (2011). Predictors of outcome in dogs with subcutaneous or intramuscular hemangiosarcoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238, 472-479.

50. Shor, S., Helfand, S. C., Gorman, E., & Löhr, C. V. (2009). Diagnostic exercise: epithelioid hemangiosarcoma mimicking metastatic prostatic neoplasia in a dog. *Veterinary Pathology*, 46, 548-552.
51. Shustef, E., Kazlouskaya, V., Prieto, V. G., Ivan, D., & Aung, P. P. (2017). Cutaneous angiosarcoma: a current update. *Journal of Clinical Pathology*, 70, 917-925.
52. Sitjar, P., Crampet, A., Yamasaki, K., & Verdes, J. M. (2020). Muerte súbita por hemangiosarcoma mediastínico primario en un canino. *Veterinaria (Montevideo)*, 56(213), e20205621302-e20205621302.52. Smith, A. N. (2003). Hemangiosarcoma in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 33, 533-552.
53. Snyder, J. M., Lipitz, L., Skorupski, K. A., Shofer, F. S., & Van Winkle, T. J. (2008). Secondary intracranial neoplasia in the dog: 177 cases (1986–2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 172-177.
54. Soares, N. P., Medeiros, A. A., Szabó, M. P. J., Guimarães, E. C., & Fernandes, L. G., Santos, T. R. D. (2017). Hemangiomas e hemangiossarcomas em cães: estudo retrospectivo de 192 casos (2002-2014). *Ciência Animal Brasileira*, 18, 1-10, e-30889.
55. Sprangler, W. L. & Culbertson, M. R. (1992). Prevalence, type, and importance of splenic diseases in dogs: 1,480 cases (1985–1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 15, 829-834.
56. Sprangler, W. L. & Kass, P. H. (1997). Pathologic factors affecting post-splenectomy survival in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11, 166-171.

57. Srebernik, N. & Appleby, E. C. (1991). Breed prevalence and sites of haemangioma and haemangiosarcoma in dogs. *Veterinary Record*, 129, 408-409.
58. Subapriya, S., Vairamuthu, S., Pazhanivel, N., Shafiuzama, M., & Bhavani, M. S. (2020). Pathology of cutaneous hemangiosarcoma in dogs. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8, 167-169.
59. Syrcle, J. A., Bonczynski, J. J., Monette, S., & Bergman, P. J. (2008). Retrospective evaluation of lingual tumors in 42 dogs: 1999–2005. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 44, 308-319.
60. Szivek, A., Burns, R. E., Gericota, B., Affolter, V. K., Kent, M. S., Rodriguez Jr, C. O., & Skorupski, K. A. (2012). Clinical outcome in 94 cases of dermal haemangiosarcoma in dogs treated with surgical excision: 1993–2007. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10, 65-73.
61. Tinsley, A. (2020). Canine hemangiosarcoma: A certainly less than ideal, very ugly cancer. *Preprints*, 1, 1-14.
62. Trappler, M. C., Popovitch, C. A., Goldschmidt, M. H., Goldschmidt, K. H., & Risbon, R. E. (2014). Scrotal tumors in dogs: A retrospective study of 676 cases (1986–2010). *The Canadian Veterinary Journal*, 55, 1229.
63. Valli, V. E., Bienzle, D. & Meuten, D. J. (2017). Tumors of the hemolymphatic system. En D.J. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals* (5th ed. pp. 209-321). Ames, Iowa: Wiley Blackwell.
64. van der Gaag, I., Vos, J. H., van der Linde-Sipman, J. S., & Koeman, J. P. (1989). Canine capillary and combined capillary-cavernous haemangioma. *Journal of Comparative Pathology*, 101, 69-74.

65. Varela, B., et al. (2022). Canine splenic tumors: Histopathological study of 9 cases in Uruguay, 2019-2020. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 15, 127-132.
66. Varela, B., Larrañaga, C., Yamasaki, K., Verdes, J. M. (2022) Histopathological case study of canine hemangiosarcoma with multiple organ metastases. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 15, 169-173.
67. Von Beust, B. R., Suter, M. M., & Summers, B. A. (1988). Factor VIII-related antigen in canine endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. *Veterinary Pathology*, 25, 251-255.
68. Ward, H., Fox, L. E., Calderwood-Mays, M. B., Hammer, A. S., & Couto, C. G. (1994). Cutaneous hemangiosarcoma in 25 dogs: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8, 345-348.
69. Warren, A. L., & Summers, B. A. (2007). Epithelioid variant of hemangioma and hemangiosarcoma in the dog, horse, and cow. *Veterinary Pathology*, 44, 15-24.
70. Weisse, C., Soares, N., Beal, M. W., Steffey, M. A., Drobatz, K. J., & Henry, C. J. (2005). Survival times in dogs with right atrial hemangiosarcoma treated by means of surgical resection with or without adjuvant chemotherapy: 23 cases (1986–2000). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 575-579.
71. 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, 1433-1441.
72. Young, R. J., Brown, N. J., Reed, M. W., Hughes, D., & Woll, P. J. (2010). Angiosarcoma. *The Lancet oncology*, 11, 983-991.

ANEXO

PROCEDIMIENTO TINCIÓN CON HEMATOXILINA - EOSINA (HE)

a) Dejar las láminas over-night en estufa.

b) Desparafinar con:

Xilol 1: durante 10'

Xilol 2: durante 15'

c) Hidratar con alcoholes decrecientes:

100°GL (pasajes 1 y 2) - 95°GL - 70°GL (menos de 1' en c/u)

d) Lavar con H₂O corriente (último enjuague con H₂O destilada)

e) Hematoxilina: 10'

f) Lavar con H₂O corriente: 10' corriendo el H₂O fuerte.

g) Eosina: 3 – 4'

h) Lavar H₂O corriente (suave).

i) Deshidratar con alcoholes crecientes:

70°GL - 95°GL - 100°GL (pasajes 1 y 2)

Xilol 1

Xilol 2

j) Montar

PROCEDIMIENTO TINCIÓN CON TECNICA TRICRÓMICA DE MASSON

a) Dejar las láminas *over-night* en estufa.

b) Desparafinar con:

Xilol 1: durante 10'

Xilol 2: durante 15'

c) Hidratar con alcoholes decrecientes:

100°GL (pasajes 1 y 2) - 95°GL - 70°GL (menos de 1' en c/u)

d) Lavar con H₂O corriente (último enjuague con H₂O destilada)

e) Teñir las láminas con Hematoxilina férrica de Weigert (Solución de trabajo) durante 5'

f) Lavar con H₂O corriente durante 2'

g) Aplicar a las laminas solución escarlata de Biebrich-fuscina ácida durante 15'

h) Lavar con H₂O destilada

i) Diferenciar con solución acuosa de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico durante 15'

j) Sin lavar, aplicar solución de verde luz (light green) al 2 por 100 5-10'

k) Lavar con H₂O destilada

l) Aplicar solución de ácido acético (1%) durante 3-5'

m) Deshidratar rápidamente en 2 cambios de alcohol 95° GL, seguido de 2 cambios de alcohol absoluto (100°GL)

Xilol 1

Xilol 2

n) Montar



Case Report

Histopathological case study of canine hemangiosarcoma with multiple organ metastases

Belén Varela¹, Camila Larrañaga¹, Kanji Yamasaki¹, José Manuel Verdes^{1*}

¹Pathology Unit, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Universidad de la República (Udelar).
Route 8 km.18 and Route 102, CP 13000, Montevideo, Uruguay.

*Corresponding author: E-mail: jmverdes@fvvet.edu.uy

Submitted July, 15th 2022, Accepted August, 30th 2022

Abstract

We studied a 14-year-old male dog necropsied. Gross findings were hemorrhagic nodules in the spleen, liver, heart and abdominal and thoracic lymph nodes. Histologically, we homogeneously observed tumor cells often with prominent, bulging and mitotic nuclei that were pleomorphic and hyperchromatic, forming small blood vessels. Tumors in all organs were diagnosed as capillary hemangiosarcomas. No tumor cells were detected in the lungs. We presume that the primary tumor was present in the spleen, from where it metastasized multiple organs via lymphatic vessels.

Key words: dog, pathology, hemangiosarcoma, spleen.

Introduction

Hemangiosarcomas are the most common primary malignant tumors occurring in the spleen of dogs (3, 6, 11, 13), and is capable of metastasizing various organs (14). Splenic hemangiosarcomas were reported usually metastasize the heart in than 25% of cases (2). It was also described that metastases of splenic hemangiosarcomas differ between small and large dogs, the later showing metastases in the abdominal and/or thoracic organs, muscles and subcutaneous flank (14). Canine hemangiosarcomas present in general high possibility of producing metastases, and primary hemangiosarcomas of organs other than the spleen are also known to metastasize as well (4, 8-10, 15, 16, 18). In this work, we present a diagnosis of capillary hemangiosarcoma in an old, crossbred dog, that affected the spleen, liver, heart and abdominal and thoracic lymph nodes. The main purpose of this study is to characterize the morphological changes produced by the hemangiosarcoma in the different organs.

Case Description

The studied specimen was a crossbred, 14 year old male dog of large size (ca. 30 kg). General signs prior to death were disorexia to anorexia, polydipsia, oliguria, and ascites. Ultrasonographic evaluation of the patient allowed to detect nodules in the liver and spleen. The dog received symptomatic treatment, but the condition did not improve and died. Abnormal tissues found at necropsy were fixed in 10% neutral buffered formalin solution, processed, sectioned at 4 µm, and stained with hematoxylin-eosin (HE). Histological examination was performed under light microscopy by 3 experienced veterinary pathologists.

Grossly, mild bloody ascites and pericardial fluid were detected. Multiple nodules of various sizes were observed in the spleen, from less than 0.5 cm to approximately 10 cm in diameter (Fig. 1). Although a particular structure was not evident on the cut surface of these tumors, hemorrhage was a characteristic and constant finding. We found nodules of various sizes both in the liver and spleen



Figure 1. Spleen. Nodules of various sizes.

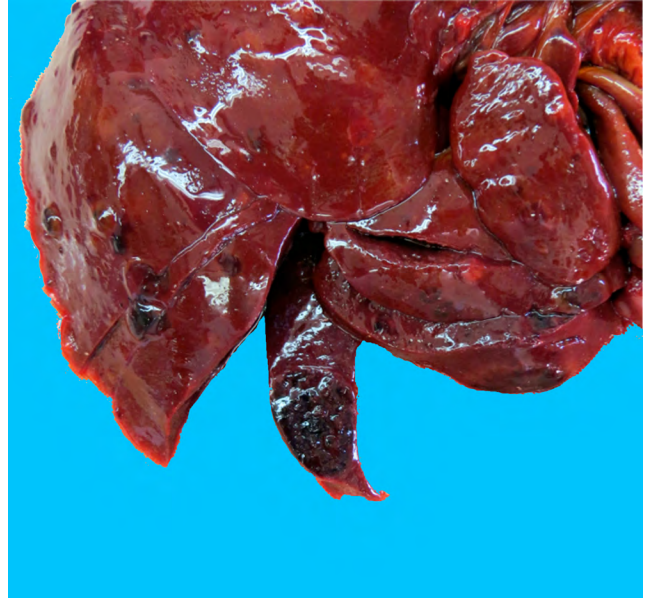


Figure 2. Liver. Nodules of various sizes.

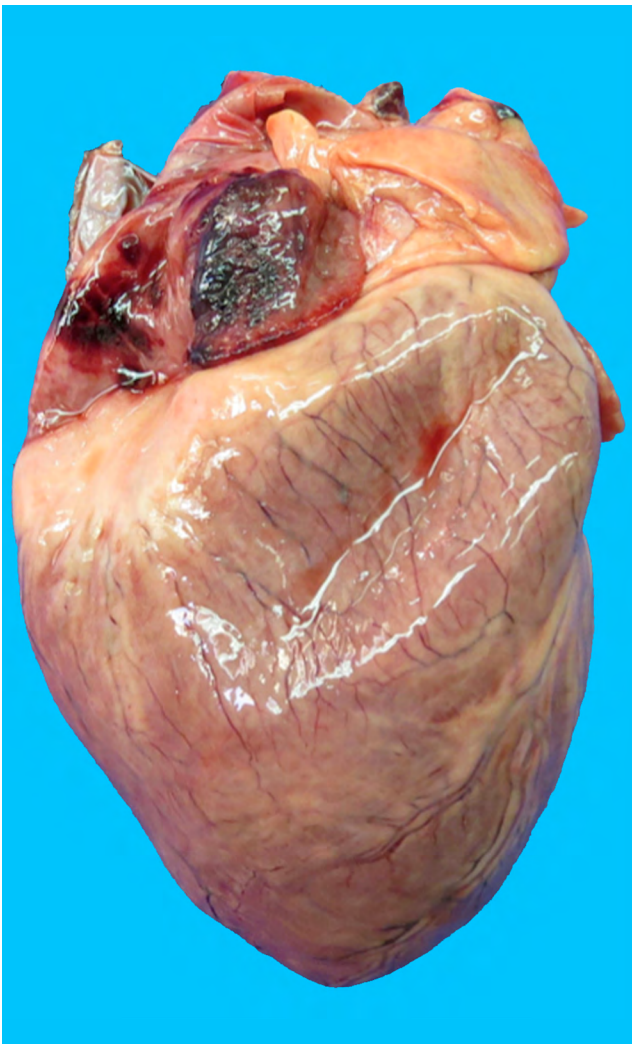


Figure 3. Heart. Nodular lesion in the right atrium.

(Fig. 2). Hemorrhage was seen in the right atrium with a tumoral mass proliferation spreading to the surrounding muscular wall (Fig. 3). The thoracic and abdominal lymph nodes, especially the mediastinal and mesenteric ones, were swollen and hemorrhagic. Congestion and edema were observed in the lungs, but no gross nodules were detected. Histologically, tumor cells proliferating in the spleen, liver, heart and lymph nodes were identified. The morphology of tumor cells in each organ was basically the same, and often presented a prominent, bulging nuclei, that were pleomorphic and hyperchromatic, commonly with mitosis. The tumor cells formed small blood vessels, some of them associated to hemorrhagic lesions. In the spleen, the normal structure of the organ disappeared, and was completely replaced by tumor cells in main tumor growth areas (Figs. 4 and 5). Necrosis and hemorrhage were more evident as extensive proliferation of tumor cells was observed. In the liver, these cells became clumpy and pressed the surrounding tissue with degeneration and necrosis of hepatocytes; infiltration of tumor cells into the sinusoids was also evident (Figs. 6 and 7). In the heart, tumor cells similar to those in the spleen and liver were seen infiltrating myocardial fibers, causing atrophy and degeneration (Figs. 8 and 9). Formation of capillaries by tumor cells was observed in some areas. In all lymph nodes, the cells infiltrated the dilated sinus, which was accompanied by the formation of miriads of capillaries plus hemorrhage (Fig. 10). Tumor cells at these locations were predominantly round, oval, spindle-shaped with distinct atypical nuclei, and often bearing mitotic figures. The lungs showed congestion and edema, but with no neoplastic changes neither observed at gross pathology nor histology. In summary, the overall pattern of growth of the hemangiosarcoma in the different organs was of capillary type.

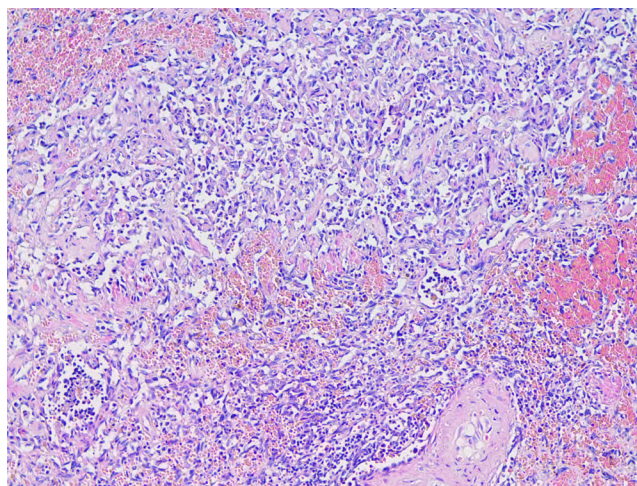


Figure 4. Spleen. Proliferated tumor cells forming blood vessels. H&E. x100.

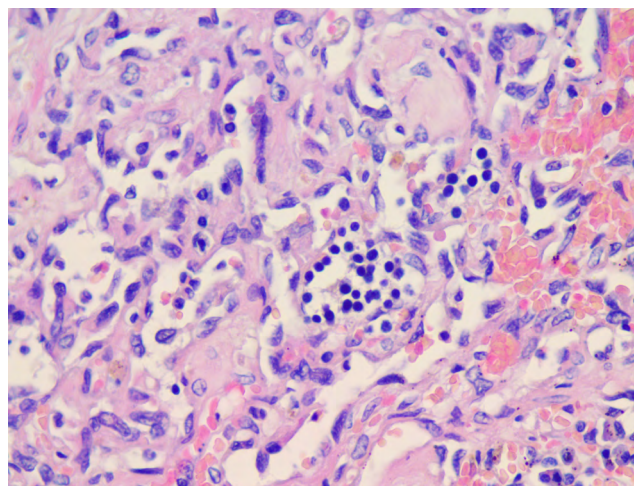


Figure 5. Spleen. High magnified Figure 4. Formation of capillaries by tumor cells. H&E. x400.

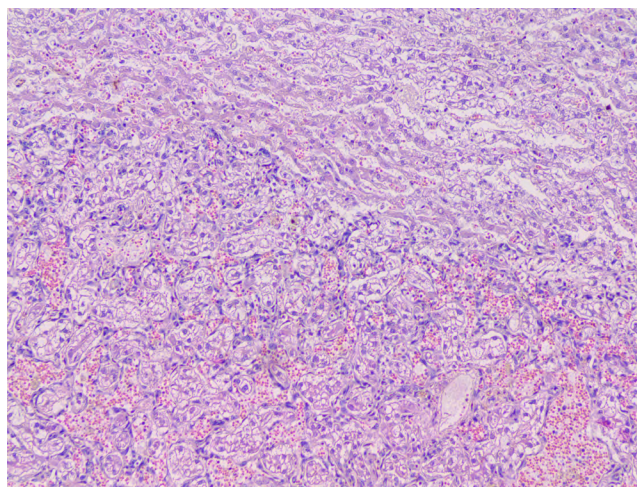


Figure 6. Liver. Proliferated tumor cells pressing the surrounding hepatocytes. H&E. x100.

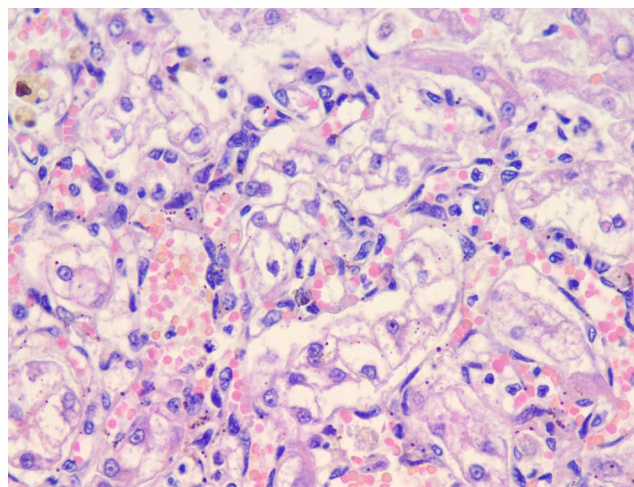


Figure 7. Liver. High magnified Figure 6. Proliferation of tumor cells in sinusoids. H&E. x400.

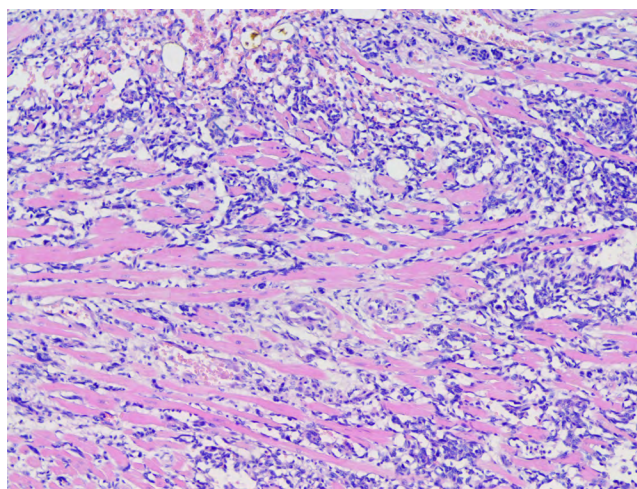


Figure 8. Heart. Invaded tumor cells between myocardial fibers. H&E. x400.

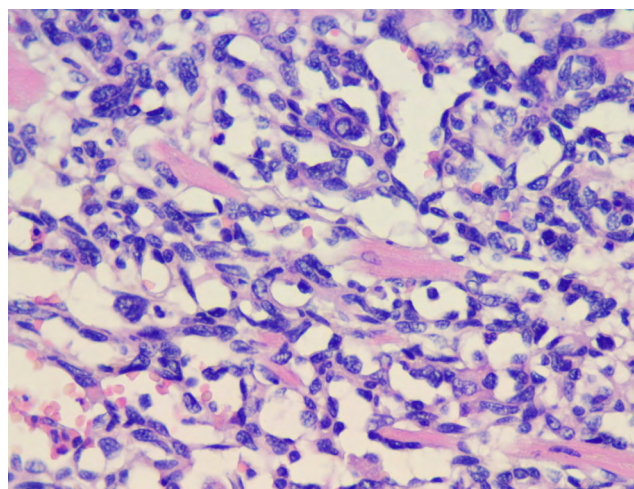


Figure 9. Heart. High magnified Figure 8. Proliferated tumor cells with atrophy of myofibers. H&E. x400.

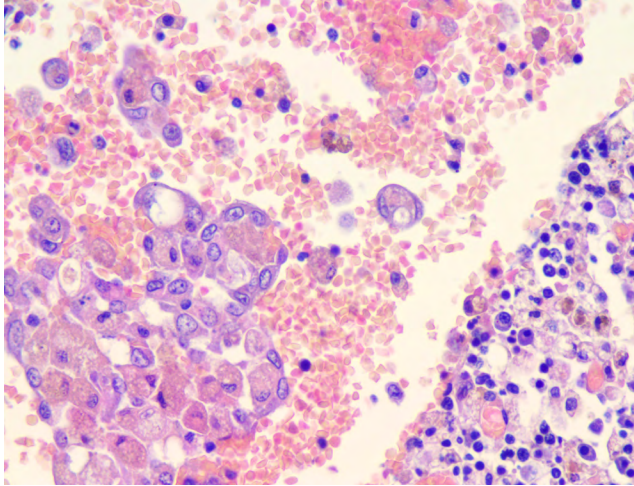


Figure 10. Mediastinal lymph nodes. Tumor cells forming capillaries in the sinus. H&E. x400.

Discussion

At first examination at the Veterinary Hospital of the Veterinary Faculty, Universidad de la República (Montevideo, Uruguay), nodules were already observed in multiple abdominal organs by ultrasonography. Histologically, although tumor cells were unequivocally detected in the spleen, liver, heart and various lymph nodes, it was difficult to determine the primary site of the tumor due to the lack registry of time-dependent clinical findings. However, it is presumed that the spleen was the primary tumor organ because of the higher number and size of tumors. Besides, the hemangiosarcoma is characteristic of this organ. If the spleen was the primary organ of the tumor in our study case, the tumors observed in the liver and heart have to be considered as metastatic lesions. It has been previously reported that canine hemangiosarcomas occur frequently in the spleen, and that this tumor is present in about 20-40% of splenic abnormalities (3, 6). In addition, more than 80% of splenic abnormal masses have been described as hemangiosarcomas (13). This tumor was reported to frequently metastasize the liver (2, 4, 8, 10, 14-16, 18), and it was also confirmed that more than 25% of splenic angiosarcomas metastasize the heart (2). Based on these reports and the present pathological findings, it is strongly possible that in our case the hemangiosarcoma first developed in the spleen, and then metastasized the liver and heart. Recently, an interesting clinical study reported the metastatic behavior of splenic hemangiosarcomas. As a result of a clinical follow-up of 34 large dogs treated with splenectomy due to splenic hemangiosarcoma, it was confirmed that metastases were found in the the following anatomical distribution: abdominal organs (including liver, kidney, omentum, and lymph nodes; $n = 23$), liver ($n = 5$), lungs and abdominal organs (including liver, kidney, omentum, and lymph nodes; $n = 2$), right cardiac atrium ($n = 4$), muscles ($n = 2$), lungs ($n = 1$), and subcutaneous flank

area ($n = 1$) (14). On the other hand, it was reported that most of the hemangiosarcomas present in the heart metastasize the lungs, and also muscles (1, 15). However, in this case, no metastases to lung or muscle were observed. Besides, the fact that tumor cell infiltration was characteristic in the sinuses of each lymph node, suggests that the metastases detected in different organs were mainly disseminated by lymphatic vessels.

Hemangiosarcomas are usually subdivided into various types of growth patterns (5, 7, 12, 17). In this study, an interesting feature is that the hemangiosarcoma found in all organs was the capillary type.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Claudio Borteiro for critically reviewing and English editing. Belén Varela and Camila Larrañaga are MSc students of Posgraduate Program of Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Belén Varela is fellowship recipient of Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEF-FVET, Udelar, Uruguay). Camila Larrañaga is fellowship recipient of Agencia Nacional de Investigación e Innovación (POS-FMV-2020-1-1010108). Kanji Yamasaki is supported by Programa de Contratación de Investigadores Provenientes del Exterior (CSIC-Udelar, Uruguay), José Manuel Verdes acknowledge to CSIC-Udelar, PEDECIBA, and ANII (Uruguay).

References

1. Carloni A, Terragni R, Morselli-Labate AM, Paninarova M, Graham J, Valenti P, Alberti M, Albarello G, Millanta F, Vignoli M. Prevalence, distribution, and clinical characteristics of hemangiosarcoma-associated skeletal muscle metastases in 61 dogs: A whole body computed tomographic study. *J Vet Intern Med.* 2019;33:812-9.
2. Clifford CA, Mackin AJ, Henry CJ. Treatment of canine hemangiosarcoma: 2000 and Beyond. *J Vet Intern Med.* 2000;14:479-85.
3. Day MJ, Lucke VM, Pearson H. A review of pathological diagnoses made from 87 canine splenic biopsies. *J Small Anim Prac.* 1995;36:426-33.
4. DeSandre-Robinson DM, Mariana T, Quina MT, David M, Lurie DM. Pericardial hemangiosarcoma in a 10-year-old Papillon. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2018;54:e54504.
5. Dickerson EB, Thomas R, Fosmire SP, Lamerato-Kozicki AR, Bianco SR, Wojcieszyn JW, Breen M, Helfand SC, Modiano JF. Mutations of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 in canine hemangiosarcoma. *Vet Pathol.* 2005;42:618-32.
6. Fernandez S, Lang JM, Maritato KC. Evaluation of nodular splenic lesions in 370 small-breed dogs (<15 kg). *J Am Anim Hosp Assoc.* 2019;55:201-9.

7. Gorden BH, Kim JH, Sarver AL, Frantz AM, Breen M, Lindblad-Toh K, Timothy D. O'Brien TD, Sharkey LC, Modiano JF, Dickerson EB. Identification of three molecular and functional subtypes in canine hemangiosarcoma through gene expression profiling and progenitor cell characterization. *Am J Pathol*. 2014;184:985-95.
8. Guinan J, Fischetti A, Garate AP, Chalhoub S. Primary peri-aortic hemangiosarcoma in a dog. *Can Vet J*. 2012;53:1214-8.
9. Hendrick, MJ. Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: Meuten, DJ. editor. *Tumors in Domestic Animals*. 5th ed., Iowa: Wiley Blackwell; 2017. p.142-75.
10. Iwata M, Aikawa T, Miyazaki Y, Sadahiro S. Primary colonic hemangiosarcoma in a dog. *Can Vet J*. 2018;59:373-8.
11. Johnson KA, Powers BE, Withrow SJ, Sheetz MJ, Curtis CR, Wrigley RH. Splenomegaly in dogs. Predictors of neoplasia and survival after splenectomy. *J Vet Intern Med*. 1989; 3:160-6.
12. Kim JH, Graef AJ, Dickerson EB, Modiano JF. Pathobiology of hemangiosarcoma in dogs: Research advances and future perspectives. *Vet Sci*. 2015;2:388-405.
13. Leyva FJ, Loughin CA, Dewey CW, Marino DJ, Akerman M, Lesser ML. Histopathologic characteristics of biopsies from dogs undergoing surgery with concurrent gross splenic and hepatic masses: 125 cases (2012–2016). *BMC Res Notes*. 2018;11:12.
14. Story AL, Wavreille V, Abrams B, Egan A, Cray M, Laura Selmic LE. Outcomes of 43 small breed dogs treated for splenic Hemangiosarcoma. *Vet Surg*. 2020;49:1154-63.
15. Yamamoto S, Hoshi K, Hirakawa A, Chimura S, Kobayashi M, Machida N. Epidemiological, clinical and pathological features of primary cardiac hemangiosarcoma in dogs: A review of 51 cases. *J Vet Med Sci*. 2013;75:1433-41.
16. Yoo S, Kim J, Myung HW, Woo S, Chung DJ, Lee AJ, Kim HJ, Do SH, Kim HY. Primary intrapelvic hemangiosarcoma in a dog. *J Vet Med Sci*. 2016;79:192-6.
17. Valli VE, Bienzle D, Meuten DJ. Tumors of the hemolymphatic system. In: Meuten, DJ. editor. *Tumors in Domestic Animals*. 5th ed., Iowa: Wiley Blackwell; 2017. p.209-321.
18. Verbeke F, Binst D, Stegen L, Waelbers T, de Rooster H, Goethem BV. Total venous inflow occlusion and pericardial auto-graft reconstruction for right atrial hemangiosarcoma resection in a dog. *Can Vet J*. 2012;53:1114-8.



Original Full Paper

Canine splenic tumors: Histopathological study of 9 cases in Uruguay, 2019-2020

Belén Varela^{1*}, Camila Larrañaga¹, Kanji Yamasaki¹, José Manuel Verdes¹

¹Unidad Patología, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.
Av. Alberto Lasplaces 1620, CP 11600, Montevideo, Uruguay

*Corresponding author: E-mail: belenvarela42@gmail.com

Submitted December, 9th 2020, Accepted July, 13th 2022

Abstract

There are no reports of what kind of spleen tumors have developed within a certain period of time in Uruguay. Therefore, we investigated spleen tumors that were surgically resected and brought into our laboratory for a year (2019-2020). As a result, 9 splenic tumors were observed. Hemangiosarcomas occurred at the highest incidence in 6 of 9 cases. In addition, 1 case each of lymphoma, fibrosarcoma, and perivascular wall tumor was observed. Furthermore, the perivascular wall tumor, which has not been reported so far, was observed in a seven years-old female Cocker Spaniel.

Key words: dogs, pathology, spleen, tumor.

Introduction

Hemangiosarcoma has been described as the most common splenic tumors in dogs in some countries (1,3,8,10), and lymphoma has been well documented in the spleen (18). In addition, splenic tumors such as osteosarcoma, fibrosarcoma, leiomyosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, myxosarcoma, perivascular cell tumor and rhabdomyosarcoma have also been reported (1,11,15,19). In South America, there have been no reports of histopathologic typification and epidemiologic study of spleen tumor has developed within a period. Therefore, we morphologically examined surgically resected splenic tumors brought to our laboratory for one year in order to investigate frequency of spleen tumors in Uruguay.

Materials and methods

Samples of 9 spleen tumors surgically removed from canines by private veterinary clinics from 2019 to 2020 were referred to the Diagnostic Pathology Laboratory of Facultad de Veterinaria – Universidad de la República (Montevideo, Uruguay) for histopathological diagnosis. The breeds examined were: Labrador Retriever (3/9), Crossbred (2/9), German Shepherd (1/9), Rodesian ridgeback (1/9), Golden Retriever

(1/9) and Cocker spaniel (1/9). There were 4 males and 5 females. The mean age of dogs was 9.6 years old (range 7-12 y. o.). Samples were fixed in 10% buffered formalin solution, processed, sectioned at 4 µm, stained with hematoxylin-eosin (H&E). Histopathological examination was performed under light microscopy by four veterinary pathologists (BV, CL, KY, JMV). The expression of the Factor VIII marker was evaluated in the selected samples according to protocols previously established by other authors (7,12,13). For this study, tissue sections were deparaffinized with xylene and hydrated through a series of decreasing gradation of passages in ethanol (100°, 95°, 70°). A 3% peroxidase blockade pre-treatment was performed, then heat-mediated antigen retrieval was carried out in a steamer (Panavox, China), keeping the histological slides submerged in 0.01 M citrate buffer at pH 6.0 inside a polypropylene Coplin jar (Deltalab, Spain) for 30 min. The primary antibody was placed on the sample of the preparation, and they were left in a humid chamber at 4 °C overnight. The next morning, the detection system (Mouse-on-canine HRP-polymer, Biocare Medical, USA) and Streptavidin peroxidase were added. The visualization of the labeling was achieved from the use of Diaminobenzidine for 3 to 5 min., controlling the evolution of the process by permanent observation of the preparation under a microscope. Samples were counterstained with Mayer's hematoxylin.

Table 1. Data, histopathological and immunohistochemical (IHC) diagnosis in each case

Case N°.	Breeds	Sex	Age (years)	Histological diagnosis	IHC against Factor VIII
1	Rodensian ridgeback	Female	9	Hemangiosarcoma (capillary type)	Positive
2	Crossbred	Male	9	Hemangiosarcoma (capillary type)	Positive
3	German shepherd	Male	12	Hemangiosarcoma (capillary type)	Positive
4	Labrador Retriever	Male	12	Hemangiosarcoma (capillary type)	Positive
5	Cross	Female	11	Hemangiosarcoma (cavernous type)	Positive
6	Golden Retriever	Male	7	Hemangiosarcoma (solid type)	Positive
7	Labrador Retriever	Female	7	Lymphoma	Negative
8	Labrador Retriever	Female	12	Fibrosarcoma	Negative
9	Cocker spaniel	Female	7	Perivascular wall tumor	Negative

Positive controls were performed according to the manufacturer's instructions. For the negative controls, the primary antibody was replaced in samples of the same tissues by PBS, which were run in parallel and at the same time as the samples to which the primary antibody was added.

Results

Of the 9 cases under study, 6 came from the city of Montevideo, 2 from Canelones and 1 from Florida. Macroscopically, 4 of them presented a nodular neoplastic growth while 3 showed a diffuse growth. 2 of them have no macroscopic description. Hemangiosarcoma was found in 6 cases, and in each case fibrosarcoma, lymphoma, and perivascular wall tumor were also found (Table 1). Multiple primaries were not found. In hemangiosarcoma, the neoplastic cells often had prominent, bulging nuclei that were pleomorphic and hyperchromatic with mitoses in all cases. According to the main growth patterns of hemangiosarcoma, the capillary type was demonstrated in 4 cases, and the cavernous and solid types in 1 case, respectively (Figs. 1, 2 and 3). In the capillary histological type, the growth pattern was infiltrative, the neoplastic cells were arranged in monolayers or multiple layers along the collagen trabeculae or collagen fibers, forming irregular blood vessels. No invasion to blood or lymphatic vessels was observed, the maximum mitotic rate was 3 mitoses per 10 high-resolution fields. The neoplastic cells in the capillary hemangiosarcomas presented low pleomorphism and one of the cases presented atypical mitoses and more than 10 cells with multiple nuclei in 10 high-resolution fields. In the cavernous type, the growth pattern was expansive, without invasion of blood and/or lymphatic vessels, the neoplastic blood vessels were generally separated by fibrous connective tissue. In this case, the blood vessels varied in size and were often filled with blood cells. The cells of this tumor type presented a mitotic index of 2 mitoses per 10 high-resolution fields, their cells showed low pleomorphism and a high nucleus-to-cytoplasm ratio, more than 10 cells in 10 high-resolution fields showed multiple nuclei. Finally, in the case of the solid type, the growth pattern was non-

infiltrative, the neoplastic proliferation was composed of solid cords of neoplastic cells that retained the ability to form vascular channels and some of them invaded normal blood vessels. Its mitotic index was 10 per high resolution field, presenting high pleomorphism, 4 atypical mitoses and more than 10 cells with multiple nuclei in 10 high resolution fields. Neoplastic cells had a 1:1 nucleus-cytoplasm ratio.

In another case, the marginal zone of lymphoid follicles proliferated, resulting in blurred borders between adjacent lymphoid follicles (Fig. 4). Lymphocytes in the proliferating marginal zone were rich in cytoplasm with medium-sized round to elliptical nuclei with clear chromatin, but no mitoses were observed. The neoplastic cells invaded blood and lymphatic vessels. This case was finally diagnosed as marginal zone lymphoma.

A fibrosarcoma composed of intertwined bundles of immature fibroblasts that produce collagen (Fig. 5) and invade blood vessels. In addition, mucin production was also detected in some areas. The growth pattern was expansive with a line of demarcation separating cell proliferation from an area of necrosis. Nuclear dysplasia, cells with multiple nuclei, and mitoses were frequently observed in tumor cells. High nucleus-cytoplasm ratio in these cells.

The final case reported here was a perivascular wall tumor whose growth pattern was infiltrative, characterized by the formation of concentric layers of spindle-shaped tumor cells centered around small blood vessels (Fig. 6). Most of the neoplastic cells were spindle cells, but occasionally polygonal cells and multinucleated cells were also found, producing collagen, with large nuclei in relation to the cytoplasm, the mitotic index was 8 mitoses per 10 high-resolution fields, without cells with atypical mitoses or multiple nuclei.

Immunohistochemistry performed with von Willebrand Factor-related antigen confirmed the presence of strongly marked neoplastic endothelial cells in capillary (Fig. 7), cavernous (Fig. 8), and solid (Fig. 9) hemangiosarcoma. The fibrosarcoma (Fig. 10), the perivascular tumor (Fig. 11) and the lymphoma (Fig. 12) did not show any labeling in the neoplastic cells. The normal vessels of the different specimens were used as positive controls of the technique.

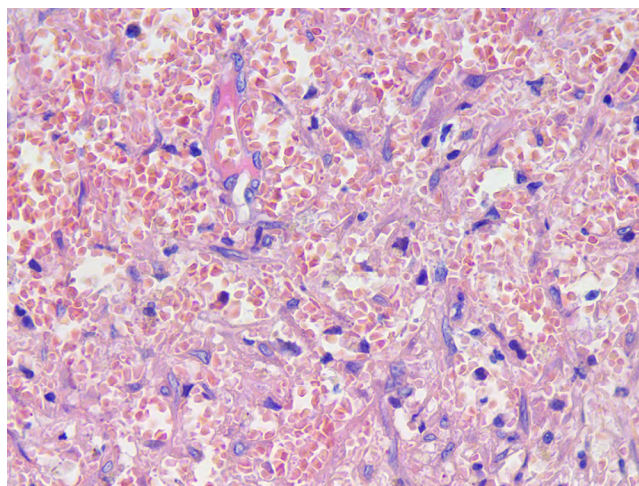


Figure 1. Hemangiosarcoma. Capillary type. Vascular spaces formed by single and multiple layers of neoplastic cells supported by collagen trabeculae and collagen fibers (H&E, 400x).

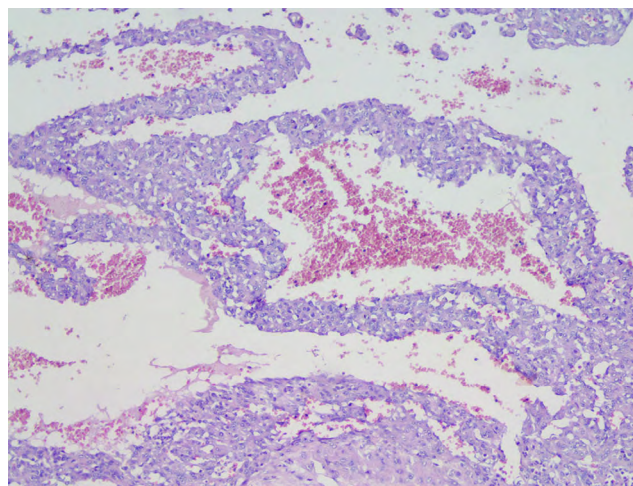


Figure 2. Hemangiosarcoma. Cavernous type. Neoplastic blood vessels of variable size and separated by fibrous tissue (H&E, 400x).

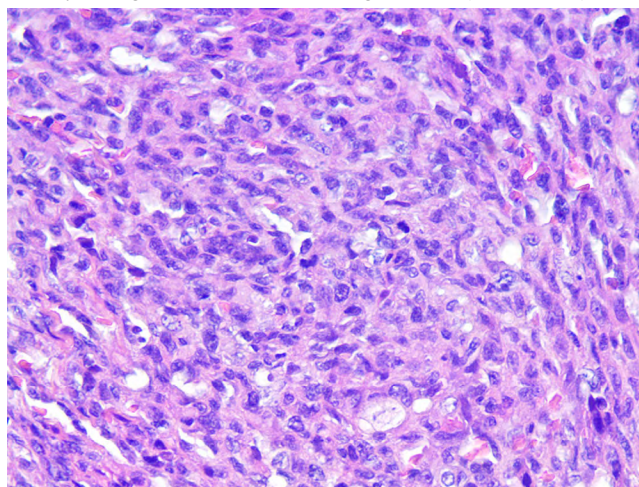


Figure 3. Hemangiosarcoma. Solid type. Solid cords formed by proliferating spindle cells surrounding small vascular channels (H&E, 400x).

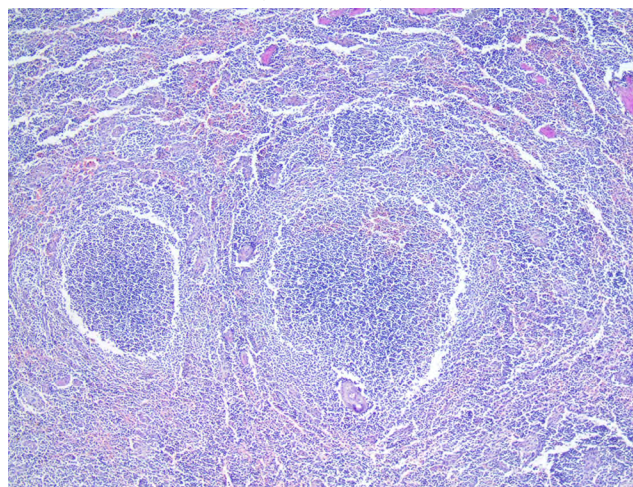


Figure 4. Lymphoma. Unclear borders between lymphoid follicles with proliferation of the marginal zone (H&E, 100x).

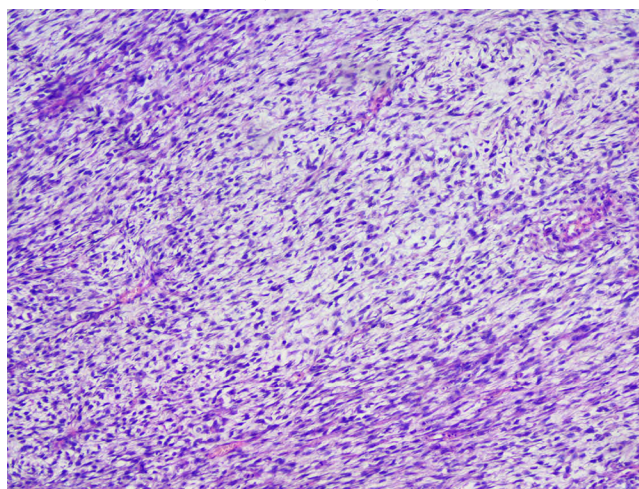


Figure 5. Fibrosarcoma. Spindle-shaped fibroblast cells arranged in intersected and interlaced bundles with collagenous intracellular substance (H&E, 100x).

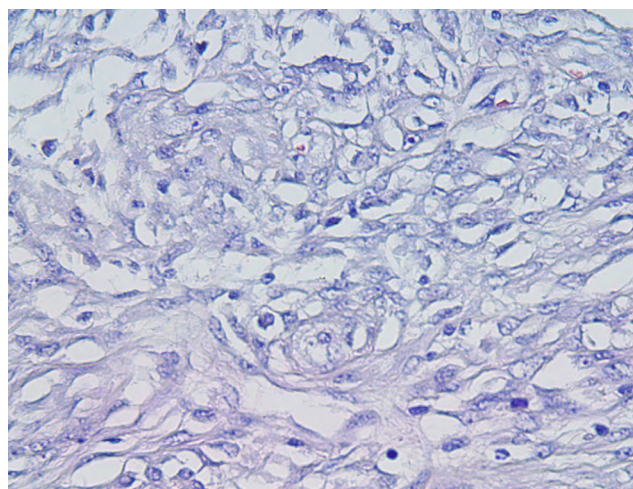


Figure 6. Perivascular wall tumor. Concentric formation of proliferating spinoid cells around small blood vessels (H&E, 100x).

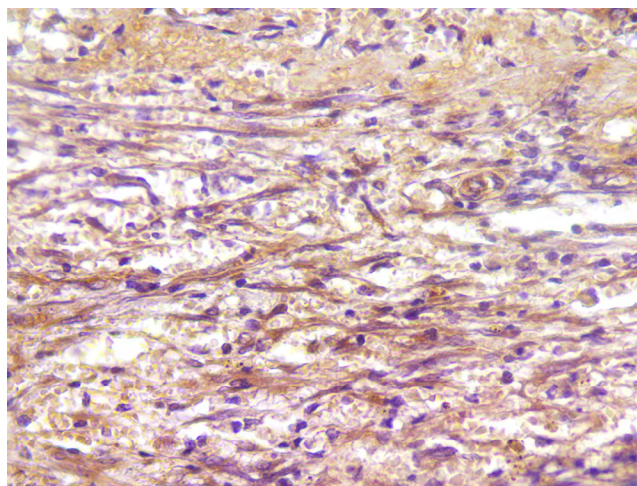


Figure 7. Hemangiosarcoma. Capillary type. Positive immunostaining against von Willebrand factor related antigen (IHC against factor VIII-related antigen, 100x).

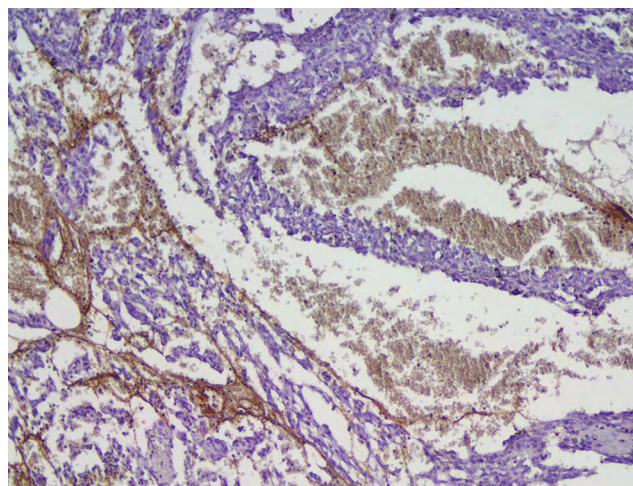


Figure 8. Hemangiosarcoma. Cavernous type. Positive immunostaining against von Willebrand factor related antigen (IHC against factor VIII-related antigen, 100x).

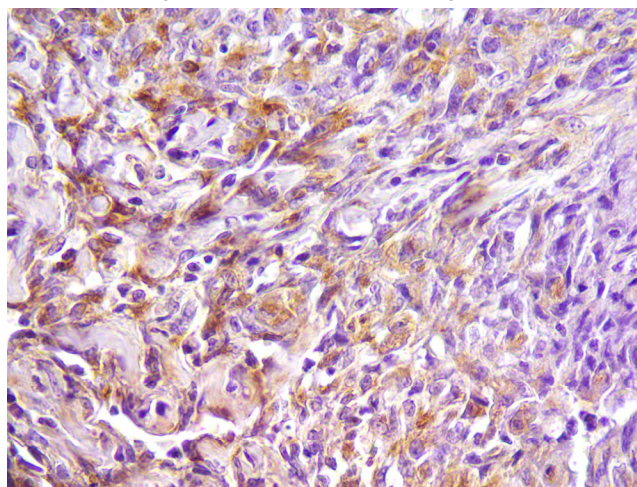


Figure 9. Hemangiosarcoma. Solid type. Positive immunostaining against von Willebrand factor related antigen (IHC against factor VIII-related antigen, 100x).

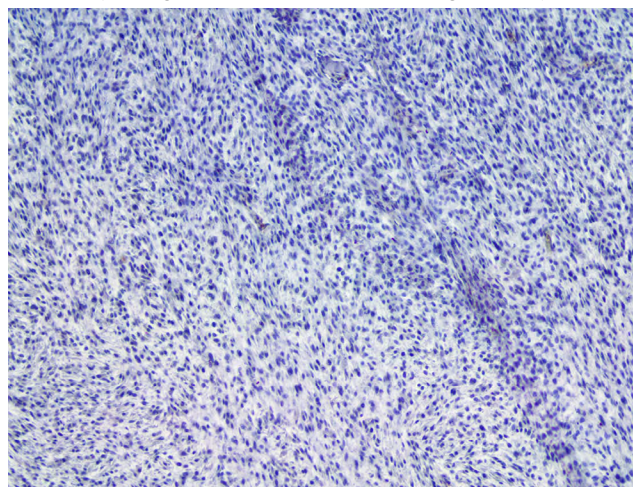


Figure 10. Fibrosarcoma. Negative immunostaining against von Willebrand factor related antigen (IHC against factor VIII-related antigen, 100x).

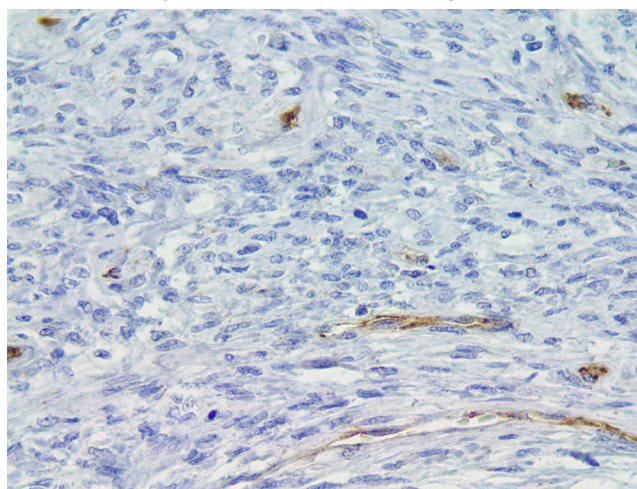


Figure 11. Perivascular wall tumor. Negative immunostaining against von Willebrand factor related antigen (IHC against factor VIII-related antigen, 100x).

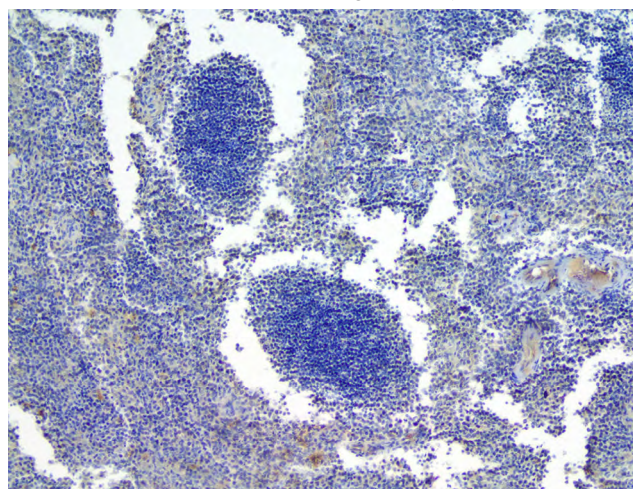


Figure 12. Lymphoma. Negative immunostaining against von Willebrand factor related antigen (IHC against factor VIII-related antigen, 40x).

Discussion

It is well known that hemangiosarcoma and lymphoma are frequent tumors of the spleen. Hemangiosarcoma has been reported to be present in about 20–40% of splenic abnormalities (1,3). It has also been reported that 80% of hemangiosarcomas were found in the biopsy materials of the abnormal spleens (10). The most common tumor in this study was hemangiosarcoma, which accounted for 60%. Hemangiosarcoma has been described to be divided into various growth patterns (2,4,9,17). In the present hemangiosarcomas, capillary growth patterns occurred most frequently in 4 out of 6 cases. The epithelioid growth pattern is considered to be highly malignant (14), but it was not observed in this study. The lymphoma described here was diagnosed as marginal zone lymphoma based on its morphological pattern. This type of lymphoma has been reported to occur frequently in dogs (11,18).

The mesenchymal sarcomas such as osteosarcoma, fibrosarcoma, leiomyosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, myxosarcoma, hemangiopericytoma and rhabdomyosarcoma have been reported as non-angiogenic and non-hematogenic splenic sarcomas (1,11,15,19). In this study, fibrosarcoma was observed in one case. Fibrosarcoma was diagnosed based on the results of morphological characteristics. On the other hand, perivascular wall tumor (hemangiopericytoma) was found in one case. This tumor is known to occur in the skin (6). To our knowledge, only one case of splenic perivascular wall tumor has been reported (11). According to information from the veterinarian surgeon, this case was not associated with a skin tumor. In addition, the perivascular tumors of the skin have been reported to have spread to the lungs, breast, internal iliac lymph nodes and lumbar lymph nodes (5,16), but not to the spleen. Therefore, we suggested that the tumor described here was a primary splenic tumor.

In conclusion, morphological studies were performed on 9 surgically removed splenic tumors brought to our laboratory for one year. As a result, hemangiosarcoma was found in 6 cases, and lymphoma, fibrosarcoma and perivascular wall tumor were found in 1 case each.

References:

- Day MJ, Lucke VM, Pearson H. A review of pathological diagnoses made from 87 canine splenic biopsies. *J Small Anim Prac.* 1995;36:426-433.
- Dickerson EB, Thomas R, Fosmire SP, et al. Mutations of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 in canine hemangiosarcoma. *Vet Pathol.* 2005;42:618-632.
- Fernandez S, Lang JM, Maritato KC. Evaluation of Nodular Splenic Lesions in 370 Small-Breed Dogs (<15 kg). *J Am Anim Hosp Assoc.* 2019;55:201-209.
- Gorden BH, Kim JH, Sarver AL, et al. Identification of three molecular and functional subtypes in canine hemangiosarcoma through gene expression profiling and progenitor cell characterization. *Am J Pathol.* 2014;184:985-995.
- Handharyani E, Ochiai K, Kadosawa T, Kimura T, Umemura T. Canine hemangiopericytoma: an evaluation of metastatic potential. *J Vet Diagn Invest.* 1999;11:474-478.
- Hendrick, MJ. Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: Meuten, DJ. Editor. *Tumors in Domestic Animals.* 5th ed., Iowa: Wiley Blackwell; 2017. p.142-175.
- Jennings, R. N., Miller, M. A., & Ramos-Vara, J. A. Comparison of CD34, CD31, and factor VIII-related antigen immunohistochemical expression in feline vascular neoplasms and CD34 expression in feline nonvascular neoplasms. *Veterinary pathology.* 2012;49:532-537.
- Johnson KA, Powers BE, Withrow SJ, et al. Splenomegaly in dogs. Predictors of neoplasia and survival after splenectomy. *J Vet Intern Med.* 1989;3:160-166.
- Kim JH, Graef AJ, Dickerson EB, et al. Pathobiology of hemangiosarcoma in dogs: Research advances and future perspectives. *Vet Sci.* 2015;2:388-405.
- Leyva FJ, Loughin CA, Dewey CW, et al. Histopathologic characteristics of biopsies from dogs undergoing surgery with concurrent gross splenic and hepatic masses: 125 cases (2012–2016). *BMC Res Notes.* 2018;11:12.
- Obwolo ML. Primary splenic haemangiopericytoma in a German Shepherd Dog. *J Comp Pathol.* 1986;96:285-288.
- Ramos-Vara, J. A., & Beissenherz, M. E. (2000). Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2000;12:307-311.
- Ramos-Vara, J. A., Miller, M. A., Gilbreath, E., & Patterson, J. S. Immunohistochemical detection of CD34, E-cadherin, claudin-1, glucose transporter 1, laminin, and protein gene product 9.5 in 28 canine and 8 feline meningiomas. *Veterinary Pathology.* 2010;47:725-737.
- Sabattini S, Lopparelli RM, Rigillo A, et al. Canine splenic nodular lymphoid lesions: Immunophenotyping, proliferative activity, and clonality assessment. *Vet Pathol.* 2018;55:654-653.
- Shor S, Heleford SC, Gorman E, et al. Diagnostic exercise: epithelioid hemangiosarcoma mimicking metastatic prostatic neoplasia in a dog. *Vet Pathol.* 2009;46:548-552.
- Spangler WL, Culbertson MR, Kass PH. Primary mesenchymal (nonangiomatous/nonlymphomatous) neoplasms occurring in the canine spleen: anatomic classification, immunohistochemistry, and mitotic activity correlated with patient survival. *Vet Pathol.* 1994;31:37-47.

17. Postorino NC, Berg RJ, Powers BE, et al. Prognostic variables for canine hemangiopericytoma: 50 cases (1979–1984). J Am Anim Hosp Assoc. 1988;24:501-509.
18. Valli VE, Bienzle D, Meuten DJ. Tumors of the hemolymphatic system. In: Meuten, DJ. Editor. Tumors in Domestic Animals. 5th ed., Iowa: Wiley Blackwell; 2017. p.209-321.
19. Valli VE, Vernau W, De Lorimier L P, et al. Canine indolent nodular lymphoma. Vet Pathol. 2006;43:241-256.
20. Weinstein MJ, Carpenter JL, Schunk CJ. Nonangiogenic and nonlymphomatous sarcomas of the canine spleen: 57 cases (1975-1987). J Am Vet Med Assoc. 1989;195:784-788.