

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de Doctor en
Ciencias Veterinarias

Caracterización de sarcomas felinos
en sitios de inoculación vacunal en la República Argentina

Autor: Méd. Vet. Santelices Iglesias, Olga Andrea

Directores: Dr. Barbeito, Claudio Gustavo.

Dr. Gimeno, Eduardo Juan.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Histología Descriptiva, Experimental y
Comparada, y Embriología. Laboratorio de Análisis de
Imágenes. FCV. UNLP.

Miembros del Jurado: Dra. Massone, Adriana Raquel

Dr. Minatel, Leonardo

Dr. González, Pedro Horacio

2019

*A mis seres queridos,
que forman parte de aquellas
pequeñas cosas que hacen
que la vida merezca ser vivida.*

Agradecimientos

*A las personas que me ayudaron
a transitar esta experiencia,
que me acompañaron, me formaron
y transformaron:*

A mis directores, que me guiaron con paciencia y comprensión, y me ayudaron a crecer con cada paso.

A mis jurados por sus valiosos consejos.

A mi querida mentora Adriana Graciela Duchene y a todo su equipo sin quienes esta tesis no hubiera sido posible.

A mis compañeros y amigos Fabián Nishida y Carolina Natalia Zanuzzi por brindarme sus conocimientos desinteresadamente.

A mi amiga y colega Carolina Wright por su colaboración y apoyo desinteresado.

A Miguel Atilio Risso por su apoyo en el análisis estadístico y por el cálido acompañamiento que me brindó durante el proceso.

A Diego Fernando Eiras por brindar información fundamental para el desarrollo de esta tesis.

A Hugo Héctor Ortega, Andrea Lorena Berengeno y Emilia Huber del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina. Por realizar la técnica inmunohistoquímica para la detección de FGF-2 y PDGF-B.

A Fernanda Giménez y Ana Lorena Migliorisi por su colaboración en la búsqueda bibliográfica de materiales de difícil acceso.

A mis superiores y compañeros de cátedra por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Financiamiento

Proyecto de la Universidad Nacional de La Plata, años 2015-2018. Estudios morfológicos e histoquímicos de la placenta y de diversos órganos, en animales de interés veterinario y zoológico durante distintos momentos de su desarrollo. Código: 11/V229.

Proyecto de la Universidad Nacional de La Plata, años 2015-2018. Patología experimental en neuropatías inducidas por plantas tóxicas. Código: 11/V232.

Proyecto de la Universidad Nacional de La Plata, años 2019-2022. Morfología Aplicada al Estudio de la Ontogenia, la Patología y la Diversidad Animal. Código: aprobado para su financiación, V-273.

Citas de publicaciones del trabajo de tesis

- Santelices Iglesias OA, Wright C, Santana C, Lavid A, Confente, F, Díaz M, Duchene AG, Barbeito CG, Gimeno EJ. Sarcomas felinos en sitios de inoculación: determinación de tipo histológico y grado de anaplasia de 116 casos. IX Reunión Argentina de Patología Veterinaria y VIII Seminario de la Fundación “Charles Louis Davis” en Argentina, 2014, Resumen F1, p. 86, Tandil, Argentina.
- Santelices Iglesias OA, Barbeito CG, Gimeno EJ. Caracterización de Sarcomas felinos en sitios de inoculación vacunal en la República Argentina. Jornadas de Ciencia y Técnica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Resumen S/N. Analecta Vet 2014; 32: 82. http://www.fcv.unlp.edu.ar/images/stories/analecta/vol_34_n1/Resumenes.pdf
- Santelices Iglesias OA, Lavid A, Santana C, Díaz M, Confente F, Duchene AG, Gimeno EJ, Barbeito CG. Sarcomas felinos en sitios de inoculación. Selecciones Veterinarias. 2014, 22: 60-73. [Online]

- Santelices Iglesias OA, Wright C, Duchene AG, Risso MA, Risso P, Zanuzzi CN, Nishida F, Grandinetti JAB, Lavid A, Confente F, Díaz M, Portiansky EL, Gimeno EJ, Barbeito CG. Expresión de PDGF α en sarcomas felinos asociados a sitios de inoculación. Asociación con la proliferación celular. XI RAPAVE y 12° Seminario de la Fundación CL Davis-SW Thompson en Argentina, 2018, Resumen S/N, p. 31, La Plata, Argentina.
- Santelices Iglesias OA, Wright C, Duchene AG, Risso MA, Risso P, Zanuzzi CN, Nishida F, Lavid A, Confente F, Díaz M, Portiansky EL, Gimeno EJ, Barbeito CG. Association Between Degree of Anaplasia and Degree of Inflammation with the Expression of COX-2 in Feline Injection Site Sarcomas. J. Comp. Path. 2018, Vol. 165, 45-51. [Online]

Índice

| | Página |
|--|--------|
| Lista de abreviaturas | 9 |
| Lista de tablas | 11 |
| Lista de figuras | 14 |
| Resumen | 17 |
| Summary | 19 |
| Capítulo I. Introducción | 21 |
| Capítulo II. Estudios histopatológicos y seguimiento clínico | 40 |
| Anexo I | 71 |
| Anexo II | 72 |
| Capítulo III. Expresión de COX-2 en sarcomas asociados a sitios de inoculación | 77 |
| Anexo III | 90 |
| Capítulo IV. Expresión de FGFR-2 y PDGFR α en sarcomas asociados a sitios de inoculación | 99 |
| Anexo IV | 120 |
| Discusión general | 130 |
| Conclusiones | 135 |
| Proyecciones | 136 |
| Bibliografía | 138 |

Lista de abreviaturas

| | |
|--------------|---|
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| CD31 | <i>Cluster</i> de diferenciación 31 |
| COX-1 | Ciclooxigenasa 1 |
| COX-2 | Ciclooxigenasa 2 |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DIC | Deviance Information Criterion |
| FGF | Factor de crecimiento de fibroblastos |
| FGF-2 | Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 |
| FGFR | Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos |
| FGFR-2 | Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral α |
| GA | Grado de anaplasia |
| GI | Grado de inflamación |
| HFM | Histiocitoma Fibroso Maligno |
| IFN γ | Interferón γ |
| IG | Inmunoglobulina |
| IL1 | Interleuquina 1 |
| IM | Índice mitótico |
| NSSI | Sarcomas felinos no asociados a sitios de inoculación |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PBS | Solución buffer-fosfato |

| | |
|----------------|--|
| PCNA | Antígeno nuclear de células en proliferación |
| PDGF | Factor de crecimiento de plaquetas |
| PDGF-B | Factor de crecimiento de plaquetas tipo BB |
| PDGFR | Receptor del factor de crecimiento de plaquetas |
| PDGFR α | Receptor del factor de crecimiento de plaquetas α |
| PG | Prostaglandina |
| PGE2 | Prostaglandina E2 |
| PNI | Distribución prior no informativas |
| RTU | <i>Ready to use</i> (listo para usar) |
| SSI | Sarcomas felinos asociados a sitios de inoculación |
| TX | Tromboxano |

Lista de tablas

| | Página |
|---|--------|
| Tabla 1. Criterios para asignación de puntaje para la determinación del grado de anaplasia en SSI. | 47 |
| Tabla 2. Grado de anaplasia. | 47 |
| Tabla 3. Resultados de estudios histopatológicos. | 54 |
| Tabla 4. Distribución de SSI de acuerdo a su grado de anaplasia. | 55 |
| Tabla 5. Distribución de SSI de acuerdo a su grado de inflamación. | 55 |
| Tabla 6. Reclasificación de los sarcomas según los resultados inmunohistoquímicos. | 61 |
| Tabla 7. Información clínica aportada por médicos veterinarios remitentes. | 62 |
| <i>Anexo II</i> | |
| Tabla a. Matriz de correlación Bayesiana (GA, GI) | 72 |
| Tabla b. Matriz de correlación Bayesiana (GA, variables demográficas y clínicas) | 73 |
| Tabla c. Matriz de correlación Bayesiana (GI, variables demográficas y clínicas) | 74 |
| Tabla d. Matriz de correlación Bayesiana (porcentaje de células proliferantes, variables demográficas y clínicas) | 75 |

| | | |
|------------------|---|-----|
| Tabla e. | Matriz de correlación Bayesiana (variables clínicas) | 76 |
| <i>Anexo III</i> | | |
| Tabla f. | ANOVA Bayesiano con prueba posterior (COX-2, GI). | 90 |
| Tabla g. | ANOVA Bayesiano con prueba posterior (COX-2, GA). | 91 |
| Tabla h. | ANOVA Bayesiano con prueba posterior (COX-2 (score), GI). | 92 |
| Tabla i. | ANOVA Bayesiano con prueba posterior (COX-2 (score), GA). | 93 |
| Tabla j. | ANOVA Bayesiano con prueba posterior (COX-2 (cuartiles), GI). | 94 |
| Tabla k. | ANOVA Bayesiano con prueba posterior (COX-2 (cuartiles), GA). | 95 |
| Tabla l. | Matriz de correlación Bayesiana (COX-2, GA, GI, porcentaje de células proliferantes). | 96 |
| Tabla m. | Matriz de correlación Bayesiana (COX-2, variables demográficas). | 97 |
| Tabla n. | Matriz de correlación Bayesiana (COX-2, variables clínicas). | 98 |
| <i>Anexo IV</i> | | |
| Tabla ñ. | ANOVA Bayesiano con prueba posterior (GA, FGFR-2). | 120 |

| | | |
|----------|--|-----|
| Tabla o. | ANOVA Bayesiano con prueba posterior (GA, PDGFR α). | 121 |
| Tabla p. | ANOVA Bayesiano con prueba posterior (GI, FGFR-2). | 122 |
| Tabla q. | ANOVA Bayesiano con prueba posterior (GI, PDGFR α). | 123 |
| Tabla r. | Matriz de correlación Bayesiana (FGFR-2, GA, GI, COX-2, variables demográficas y clínicas). | 124 |
| Tabla s. | Matriz de correlación Bayesiana (PDGFR α , GA, GI, COX-2, variables demográficas y clínicas). | 125 |
| Tabla t. | Matriz de correlación Bayesiana (variables vasculares). | 126 |
| Tabla u. | Matriz de correlación Bayesiana (variables vasculares, variables clínicas). | 128 |

Lista de figuras

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Imagen macroscópica de un sarcoma felino asociado a sitio de inoculación. | 24 |
| Figura 2. Fibrosarcoma. H&E 10X. | 24 |
| Figura 3. Fibrosarcoma. H&E 40X. | 25 |
| Figura 4. SSI. Infiltrado linfocítico peritumoral. H&E 10X. | 25 |
| Figura 5. Fibrosarcoma. H&E 10X. | 44 |
| Figura 6. Mixosarcoma. H&E 20X. | 44 |
| Figura 7. Sarcoma pleomórfico. H&E 40X. | 45 |
| Figura 8. Sarcoma inicialmente diagnosticado como rabdomiosarcoma. H&E 40X | 45 |
| Figura 9. Fibrosarcoma con metaplasia ósea. H&E 4 X y 10X. | 46 |
| Figura 10. Osteosarcoma extraesquelético. H&E 10X. | 46 |
| Figura 11. Fibrosarcoma. IHQ anti-cytoqueratin, DAB y hematoxilina 10X. | 56 |
| Figura 12. Piel adyacente a fibrosarcoma IHQ anti-cytoqueratin, DAB y hematoxilina 4X. | 57 |
| Figura 13. Fibrosarcoma. IHQ anti-vimentina, DAB y hematoxilina 10X. | 57 |
| Figura 14. Fibrosarcoma. IHQ anti-vimentina, DAB y hematoxilina 40X. | 58 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Figura 15. | Fibrosarcoma. IHQ anti-desmina, DAB y hematoxilina 4X. | 58 |
| Figura 16. | Fibrosarcoma. IHQ anti-desmina, DAB y hematoxilina 10X. | 59 |
| Figura 17. | Sarcoma pleomórfico. IHQ anti alfa-actina, DAB y hematoxilina 40X. | 59 |
| Figura 18. | Sarcoma pleomórfico. IHQ anticuerpo anti-desmina, DAB y hematoxilina. 4X y 40X. | 60 |
| Figura 19. | Fibrosarcoma. IHQ anti-PCNA, DAB y hematoxilina 10X. | 60 |
| Figura 20. | Macula densa de riñón canino. IHQ anti-COX-2, DAB y hematoxilina 20X. | 82 |
| Figura 21. | Sarcoma felino asociado con sitio de inoculación. IHQ anti-COX-2, DAB y hematoxilina 40X. | 82 |
| Figura 22. | Riñón canino. IHQ anti-PDGFR α , DAB y hematoxilina, 40X. | 105 |
| Figura 23. | Riñón felino. IHQ anti-PDGFR α , DAB y hematoxilina, 10X. | 105 |
| Figura 24. | Glándulas fúndicas de estómago de rata. IHQ-anti FGFR-2. DAB y hematoxilina, 40X. | 106 |
| Figura 25. | Glándulas fúndicas de estómago de gato. IHQ-anti FGFR-2. DAB y hematoxilina, 40X. | 106 |
| Figura 26. | Vasos dérmicos de piel de gato (control). IHQ anti-CD31. DAB y hematoxilina, 20X. | 107 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Figura 27. | Vasos de un SSI. IHQ anti-CD31. DAB y hematoxilina, 20X. | 108 |
| Figura 28. | SSI. IHQ anti-PDGFR α , DAB y hematoxilina, 40X. | 110 |
| Figura 29. | SSI. IHQ anti FGFR-2. DAB y hematoxilina, 40X. | 110 |
| Figura 30. | SSI. IHQ anti FGF-2. DAB y hematoxilina, 40X. | 111 |
| Figura 31. | SSI. IHQ anti-PDGF-B. DAB y hematoxilina, 40X. | 111 |
| Figura 32. | SSI. Marca nuclear. IHQ- anti FGF-2. DAB y hematoxilina, 40X. | 112 |
| Figura 33. | SSI. Marca nuclear. IHQ anti FGFR-2. DAB y hematoxilina, 40X. | 112 |

Caracterización de sarcomas felinos

en sitios de inoculación vacunal en la República Argentina

Palabras clave: sarcoma, felino, inoculación, COX-2, PDGFR, FGFR

Resumen

Los sarcomas felinos asociados a sitios de inoculación (SSI) fueron descritos por primera vez en 1991, son neoplasias de origen mesenquimático que aparecen en las regiones corporales utilizadas rutinariamente para la aplicación de vacunas u otros inóculos. El presente trabajo busca describir características morfológicas y moleculares de estos sarcomas, en la República Argentina. Para ello, se realizaron los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos necesarios para arribar al diagnóstico de cada caso, establecer su grado de anaplasia (GA) y de inflamación (GI), calcular el porcentaje de células proliferantes, evaluar la expresión de COX-2, PDGF-B, FGF-2 y sus receptores (PDGFR α y FGFR-2), y determinar vasos por campo, área y densidad vascular. Además, se recopiló información concerniente al seguimiento clínico de los casos estudiados. Se analizó la relación entre los resultados obtenidos. Se comprobó que la mayoría de los SSI en nuestro medio son fibrosarcomas y el de GA más frecuente es el II. Presentaron alta recurrencia y abundante respuesta inflamatoria asociada. Se demostró la expresión de COX-2 y su asociación con el GA, GI y vasos por campo en estas neoplasias. Se corroboró que los SSI expresan PDGF-B, FGF-2 y sus receptores. La proliferación celular se asoció a la expresión de sus receptores, y al área y la densidad vascular. Estas últimas se asociaron al tiempo de sobrevida.

Algunas de las variables estudiadas mostraron resultados de potencial valor pronóstico. Los resultados obtenidos resultan de particular interés a la hora de diseñar protocolos antineoplásicos ya que se identificaron posibles blancos terapéuticos y, por lo tanto, es posible predecir la susceptibilidad al tratamiento mediante técnicas sencillas. Serán necesarias futuras investigaciones para corroborar el valor pronóstico de estas variables y el valor terapéutico de los inhibidores de las vías metabólicas estudiadas.

Characterization of feline-injection site sarcomas in the Argentine Republic

Keywords: sarcoma, feline, inoculation, COX-2, PDGFR, FGFR

Summary

Feline injection site sarcomas (FISS) were first described in 1991, they are neoplasms of mesenchymal origin that appear in the body regions routinely used for the application of vaccines or other inocula. The aim of the present work was to describe the morphological and molecular characteristics of these sarcomas in the Argentine Republic. For this purpose, histopathological studies were performed to diagnose, and determine the degree of anaplasia (DA) and inflammation (DI) of each one. In addition, immunohistochemistry was used to calculate the percentage of proliferating cells, to determine the expression of COX-2, PDGF-B, FGF-2 and its receptors (PDGFR α and FGFR-2), and to estimate the number of vessels per field, and vascular area and density, were performed. Data from the clinical follow-up of the cases studied was recorded and analysed. Most of the FISS in Argentina were fibrosarcomas, being DA II the most frequently found. They showed high recurrence and abundant associated inflammatory response. COX-2 expression was associated with DA, DI and the number of vessels per field in these neoplasms was demonstrated. The expression of PDGF-B, FGF-2 and its receptors was corroborated in FISS. Cell proliferation was associated with the expression of their receptors, and with vascular area and density. The latter, was also associated with survival

time. Some of the variables studied showed potential prognostic value. The results obtained are of particular significance to design antineoplastic protocols since possible therapeutic targets were identified. Therefore, it is possible to predict FISS susceptibility to treatment by simple techniques. Future research will be necessary to corroborate the prognostic value of these variables and the therapeutic use of the inhibitors of the metabolic pathways studied.

Introducción

Sarcomas felinos asociados a sitios de inoculación

Los sarcomas felinos asociados a sitios de inoculación (SSI) son neoplasias de origen mesenquimático que aparecen en las regiones corporales utilizadas rutinariamente para la aplicación de vacunas u otros inóculos (Shaw y col., 2009). Estos fueron descritos por primera vez en 1991, en Estados Unidos de Norteamérica (Hendrick y Goldschmidt, 1991). Posteriormente, se diagnosticaron en la mayoría de los continentes (Hendrick y col., 1992; Dubielzig y col., 1993; Hendrick y col., 1994; Rudmann y col., 1996; Sandler y col., 1997; Burton y Mason, 1997; Briscoe y col., 1998; Madewell y col., 2001; Couto y col., 2002; Nieto y col., 2003; Martin, 2003; Jelínek, 2003; Hershey y col., 2005; Chang y col., 2006; Aberdein y col., 2007; Banerji y col., 2007; Deim y col., 2008; Munday y col., 2011; Carminato y col., 2011; Wilcock y col., 2012; Dean y col., 2012). El diagnóstico histopatológico más frecuente de SSI (80%) es un fibrosarcoma sumamente agresivo y recidivante con un alto índice de mortalidad (Hendrick y col., 1992; Goldschmidt y Hendrick, 2002; Wilcock y col., 2012). Otras variantes, tales como el histiocitoma fibroso maligno (HFM) o sarcoma pleomórfico (Hendrick, 2017), el osteosarcoma, el condrosarcoma y el rhabdomiosarcoma, se presentan con menor frecuencia (Hendrick y col., 1992; Dubielzig y col., 1993; Hendrick y Brooks, 1994; Goldschmidt y Hendrick, 2002; Wilcock y col., 2012).

La relación entre el desarrollo de sarcomas felinos y la vacunación se estableció a partir de trabajos epidemiológicos. El aumento en el número de diagnósticos de fibrosarcomas felinos se asoció en los Estados Unidos de Norteamérica al incremento en la vacunación antirrábica de la población felina tras la sanción de una ley de vacunación obligatoria para rabia en 1987 (Hendrick y col., 1992; Deim y col., 2008). La mayoría de estos tumores se originaron en regiones corporales de uso frecuente para la inoculación de vacunas. Mientras el número de fibrosarcomas en sitios no utilizados para inoculación permaneció estable. El análisis de estos resultados permitió establecer la relación etiológica entre la vacunación y el desarrollo de fibrosarcomas (Hendrick y col., 1992). Esta relación causal sólo fue comunicada en hurones (Munday y col., 2003), además de en gatos.

Aspectos morfológicos

Macroscópicamente, los SSI típicos (fig. 1) son masas blanquecinas, firmes, bien delimitadas, con un centro cavitado que contiene líquido mucinoso o acuoso (Hendrick y col., 1992; Goldschmidt y Hendrick, 2002). En cuanto al aspecto microscópico existen variaciones relacionadas con el grado de anaplasia. Si los fibrosarcomas son bien diferenciados, presentan haces entrelazados de células fusiformes. En cambio, los más anaplásicos poseen células de forma y tamaño variable con núcleos pleomórficos; muchas de las células son multinucleadas y son abundantes las figuras mitóticas (fig. 2 y 3). Es frecuente la presencia de una intensa respuesta inflamatoria periférica en la que predominan linfocitos y macrófagos

(Hendrick y col., 1992; Hendrick y Brooks, 1994; Doddy y col., 1996; Couto y col., 2002; Goldschmidt y Hendrick, 2002). Cualquiera sea su diagnóstico histopatológico, los SSI se caracterizan por presentar: un infiltrado linfocítico periférico (fig. 4), un componente miofibroblástico prominente y, a menudo, infiltración de macrófagos que contienen un material grisáceo intracitoplasmático (Madewell y col., 2001). Muchos casos presentan células gigantes intratumorales (Madewell y col., 2001).

El material intracitoplasmático que contienen los macrófagos en la respuesta inflamatoria peritumoral es idéntico al descrito en reacciones inflamatorias posvacunales. Se pudo demostrar en este material la presencia de óxido de aluminio (Hendrick y col., 1992; Deim y col., 2008), sustancia utilizada como adyuvante en las vacunas a virus muerto. También, se demostró aluminio en el centro necrótico y en las células gigantes (Deim y col., 2008).

Los SSI pueden presentar una cápsula incompleta de tejido fibroso y, a pesar de su aspecto circunscripto, es posible comprobar, con la observación microscópica, que emiten proyecciones que se alejan de la masa principal hacia planos más profundos. Aquellos tumores que se encuentran en el tejido celular subcutáneo suelen alcanzar los planos musculares (Hendrick y col., 1992; Hendrick y Brooks, 1994; Doddy y col., 1996; Goldschmidt y Hendrick, 2002).



Figura 1. Imagen macroscópica de un sarcoma felino asociado a sitio de inoculación. Se observa su color blanquecino, su aspecto bien delimitado y su centro cavitado que contiene líquido mucinoso.

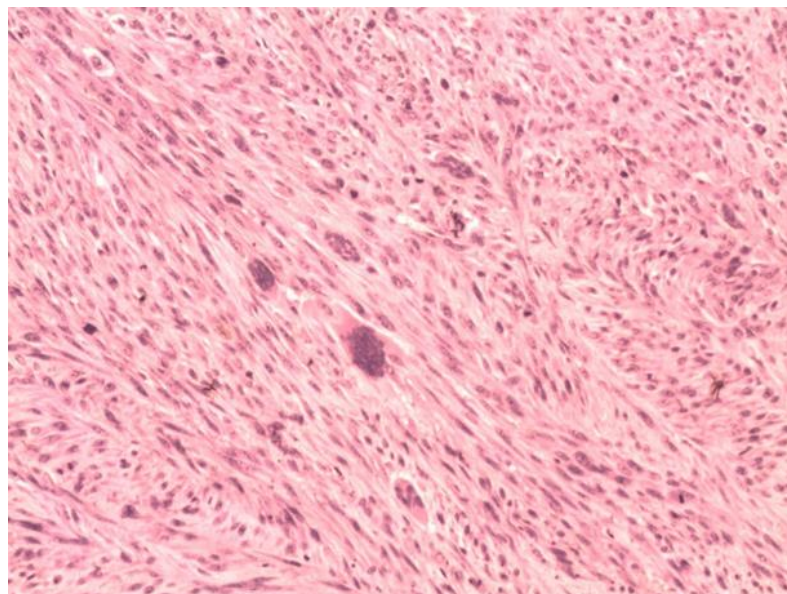


Figura 2. Fibrosarcoma en la parrilla costal de un felino de 10 años. Se observan varias células gigantes multinucleadas en el centro de la imagen. H&E 10X.

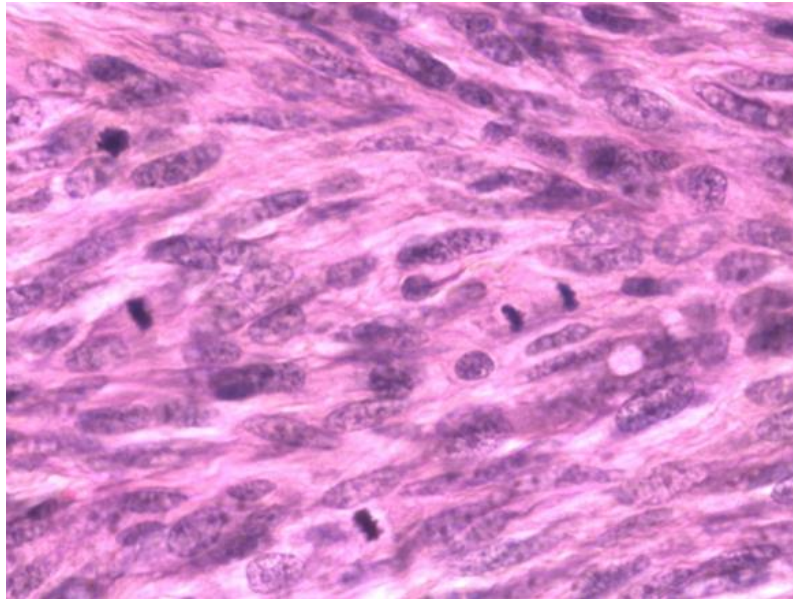


Figura 3. Fibrosarcoma en parrilla costal de felino de 10 años. Se observan, en esta imagen, abundantes figuras mitóticas y pleomorfismo celular. H&E 40X.

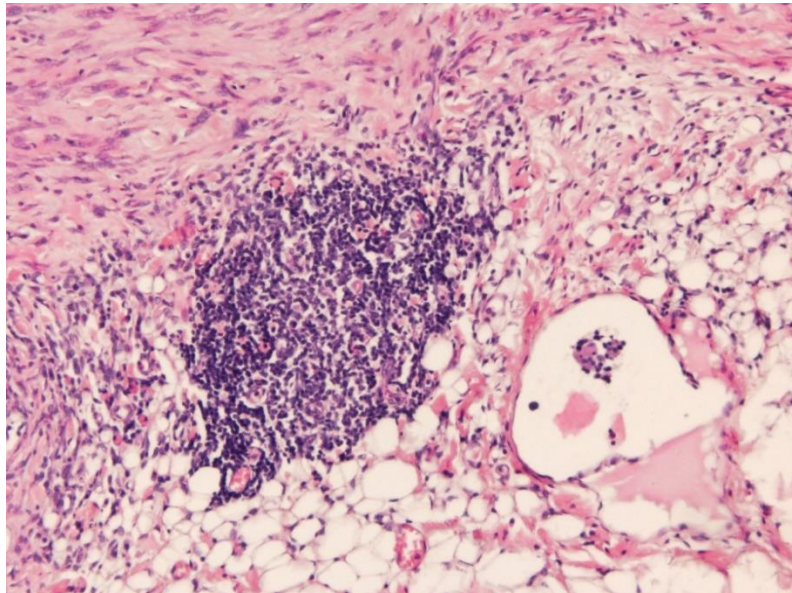


Figura 4. SSI, se observa el característico infiltrado linfocítico peritumoral. H&E 10X.

Diagnóstico

La distinción citológica entre fibrosarcoma posinoculación y reacción inflamatoria posinoculación es dificultosa debido a la similitud morfológica entre los fibroblastos del tejido de granulación y las células neoplásicas. La biopsia escisional es el método de elección para el diagnóstico (Goldschmidt y Hendrick, 2002).

El diagnóstico de SSI requiere de la identificación de sus características histológicas y de su localización en sitios tradicionalmente usados para la inoculación de vacunas (Wilcock y col., 2012).

Hipótesis respecto a su etiopatogenia

Los compuestos con aluminio son adyuvantes utilizados comúnmente en vacunas a virus muerto (Hendrick y col, 1992; Deim y col., 2008), incluyendo las de rabia y leucemia felina. Los adyuvantes a base de aluminio fueron involucrados en la etiología de granulomas de cuerpo extraño en humanos; esta reacción es idéntica a la respuesta inflamatoria hallada en sitios de inyección en perros y gatos (Hendrick y Dunagan, 1991; Hendrick y col., 1992). La presencia de agregados peritumorales de macrófagos con aluminio apoya el diagnóstico de SSI (Hendrick y col., 1992; Goldschmidt y Hendrick, 2002). Se postuló que el aluminio generaría una respuesta inflamatoria persistente que induce la síntesis de factores de crecimiento y citoquinas que estimularían la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos. Sin embargo, en un estudio de riesgo, la aparición de SSI también se relacionó con la inoculación de vacunas con adyuvantes que carecían de aluminio y sin adyuvante (Kass y col., 1993; Deim y col., 2008),

pero siempre se asoció a procesos inflamatorios crónicos. La inflamación persistente en las respuestas en los sitios de inyección predispondría a los gatos a desarrollar una respuesta reparativa que en algunos casos culminaría en una neoplasia (Hendrick y col., 1992; Kass y col., 1993; Woodward, 2011). Esta hipótesis se sustenta en el hallazgo de focos sarcomatosos microscópicos en respuestas inflamatorias granulomatosas (Hendrick y col., 1992). La transformación maligna de fibroblastos reactivos en las respuestas posvacunales ocurriría sólo en el 5% de los casos. La magnitud y duración de la inflamación estaría influenciada por la formulación de la vacuna y condicionada por el genoma del paciente (Wilcock y col., 2012).

Los fibroblastos pueden sufrir transformación neoplásica a través de diferentes mecanismos, incluida la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores tumorales. Los factores de crecimiento, producidos durante la respuesta inflamatoria crónica, no sólo promueven la proliferación de los fibroblastos, sino también pueden inducir su transformación maligna y la angiogénesis local, procesos indispensables para la carcinogénesis. Su sobreexpresión fue hallada en diferentes tumores y se relacionó con la etiopatogenia de la carcinogénesis (O'Byrne y Dalgleish, 2001).

La inflamación crónica puede inducir la producción de radicales libres y metabolitos que generan daños en el ADN y mutaciones, actuando como iniciadores de la carcinogénesis. El factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) está íntimamente relacionado con los procesos inflamatorios, la

angiogénesis y el desarrollo de tumores mesenquimáticos. Se demostró su expresión en SSI por lo que podría estar involucrado en su patogenia. Algunos mediadores inflamatorios, como citoquinas y prostaglandinas, pueden inducir la liberación de FGF-2 por las células tumorales. Este factor estimula el crecimiento y la supervivencia celular, suprime la respuesta inmune mediada por células y promueve la angiogénesis. El ambiente provisto por la inflamación crónica sumado a una predisposición genética alteraría la susceptibilidad ante injurias carcinogénicas (O'Byrne y Dalglish, 2001; Nieto y col., 2003).

Según Hendrick (1999), la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y su receptor (PDGFR) se comprobó en SSI, en cambio no fue detectada en sarcomas no asociados a la inoculación de vacunas. Hendrick (2011) afirma que la estimulación de receptores de factores de crecimiento, especialmente PDGFR, forma parte de la patogenia de estas neoplasias.

También, fueron propuestas otras hipótesis para explicar el origen de SSI. Banerji y sus colaboradores demostraron que existe asociación entre variaciones del gen p53 y la aparición de SSI. La detección de estos marcadores genéticos podría ayudar a predecir el riesgo de desarrollo de estos tumores en gatos aparentemente sanos (Banerji y col., 2007).

Otra hipótesis propuesta es la de oncogénesis viral que postula que algunos virus, además de los oncogenes celulares, podrían jugar algún rol en la inducción de SSI (Deim y col., 2008). Sin embargo, nunca se pudieron

detectar partículas virales en estas neoplasias (Madewell y col., 2001; Banerji y col., 2007; Deim y col., 2008).

Los sarcomas intraoculares felinos, asociados a historia de trauma o inflamación crónica previos, comparten características con los SSI. Esto podría explicarse por la existencia de predisposición genética, en ciertos gatos, al desarrollo de neoplasias como consecuencia de procesos inflamatorios crónicos o reparativos (Perlmann y col., 2011). Existen múltiples estudios que sugieren la existencia de esta predisposición genética para el desarrollo de sarcomas, que favorecerían que los cambios locales ocurridos durante el proceso inflamatorio puedan desencadenar una neoplasia (Banerji y col., 2007).

Comportamiento biológico y clínico

Los SSI se originan en sitios de inoculación tales como cuello, región interescapular, tórax, región dorso lumbar, flanco y miembros posteriores (Hendrick y col., 1992; Hendrick y Brooks, 1994; Goldschmidt y Hendrick, 2002). Los distintos diagnósticos histopatológicos, previamente mencionados, no poseen diferencias pronósticas (Wilcock y col., 2012).

Estas neoplasias no presentan predilección sexual, aparecen en gatos desde los 3 años de edad, aunque la edad promedio de aparición es de 8,1 años, menor a la de los sarcomas no asociados a sitios de vacunación que surgen a una edad promedio de 9,2 años (Hendrick y col., 1994; Goldschmidt y Hendrick, 2002). Además, los sarcomas no asociados a la vacunación son menos agresivos y recidivantes (Deim y col., 2008).

Se calculó que la prevalencia de los SSI es de 1:1000 a 1:10000 gatos vacunados (Kass y col., 1993; Goldschmidt y Hendrick, 2002; Wilcock y col., 2012). Aunque, como esta estimación se basa en los casos remitidos para confirmación histológica, la prevalencia real probablemente sea mayor dado el número de casos no remitidos para su estudio histopatológico (Wilcock y col., 2012).

El intervalo más frecuente entre la vacunación y la aparición del tumor se encuentra entre los 3 meses y los 3 años posinoculación (Hendrick y col., 1992). Sin embargo, puede llegar a los 15 años (Wilcock y col., 2012).

Los SSI son neoplasias sumamente invasivas, el riesgo de recidiva es alto, aun cuando el cirujano y el patólogo consideren que la resección fue completa, pueden ser extirpadas quirúrgicamente de una a tres veces en un lapso de uno a dos años (Hendrick y col., 1994; Goldschmidt y Hendrick, 2002). Sin embargo, una escisión quirúrgica agresiva, que permita lograr un amplio margen, puede extender el intervalo libre de tumor y la sobrevida (Davidson y col., 1997; Hershey y col., 2000; Goldschmidt y Hendrick, 2002; Wilcock y col., 2012). Podría ser necesaria, según la localización de la neoplasia, la amputación del miembro, la escapulectomía total o parcial, la resección de músculos epiaxiales y procesos espinosos vertebrales y de al menos un plano fascial por debajo del tumor para lograr un margen de 3 a 5 cm de tejido macroscópicamente libre de extensión neoplásica (Hendrick y Brooks, 1994; Martano y col., 2011). Algunos trabajos preliminares sugieren que este intervalo también podría extenderse con el uso de quimioterapia o de combinaciones de inmunoestimulantes y radioterapia

(Goldschmidt y Hendrick, 2002). Una de las drogas utilizadas, la doxorubicina, no logró detener el progreso de SSI inoperables pero sí mejoró la sobrevida en un estudio realizado en 12 casos (Martano y col., 2011). En otros trabajos no se hallaron diferencias significativas entre los grupos intervenidos quirúrgicamente y los tratados con la combinación de Doxorubicina y cirugía (Martano y col., 2011).

En la mayoría de los casos, los gatos son sometidos a eutanasia luego de varias cirugías con o sin terapia adyuvante. El potencial metastásico de estos tumores inicialmente es bajo, pero aumenta con la sobrevida prolongada (Goldschmidt y Hendrick, 2002; Wilcock y col., 2012). Fueron encontradas metástasis en linfonodos regionales, mediastino, pulmones (Hendrick y col, 1994; Rudmann y col., 1996; Briscoe y col., 1998; Goldschmidt y Hendrick, 2002), hígado y omento (Sandler y col., 1997).

Situación actual

Luego de haber sido descritos por primera vez en 1991, la identificación de estos sarcomas motivó cambios en los protocolos de vacunación en 1996 (que incluían la recomendación de modificar los sitios de inoculación) y que en el año 2000 se introdujeran, en Canadá, vacunas de rabia sin adyuvante, para uso en gatos. Sin embargo, tras estas modificaciones, no hubo cambios ni en la prevalencia ni en la edad de presentación de los SSI. Solamente se registró una variación en la ubicación corporal en correspondencia a los nuevos sitios recomendados para vacunación. Antes de 1996 la localización interescapular era cinco veces más frecuente que las otras; luego de ese año la ubicación más frecuente fue en los miembros

posteriores y áreas adyacentes (Shaw y col., 2009; Wilcock y col., 2012). Por esto, no existiría razón para modificar los sitios de inoculación más allá de la factibilidad de lograr un amplio margen quirúrgico como sucede en el caso de los miembros o del rabo.

Las vacunas sin adyuvante (recombinantes) no causan inflamación significativa, por lo tanto, no deberían causar sarcomas. La falla en la disminución de la prevalencia podría deberse a que, en realidad y pese a las indicaciones, éstas no reemplazaron, en la práctica, a las vacunas tradicionales debido a su mayor costo, a pesar del bajo riesgo de desarrollo de SSI (Wilcock y col, 2012).

Actualmente, algunos autores sostienen que otros productos inoculados pueden promover el desarrollo de sarcomas (MacEwen y col., 2001; Martano y col., 2011). Cualquier sustancia que genere una respuesta inflamatoria local persistente podría llevar al desarrollo de sarcomas en gatos susceptibles, pero son las vacunas las que son inoculadas con mayor frecuencia en la población felina y por esto tendrían mayor correlación con la enfermedad (MacEwen y col., 2001).

Ciclooxigenasa 2 en las neoplasias

Como se mencionó anteriormente existen múltiples hipótesis respecto a la etiopatogenia de los SSI. La más aceptada involucra al proceso inflamatorio, inducido por los adyuvantes de las vacunas a virus muerto, como parte fundamental en la génesis y progresión de estas neoplasias

(Hendrick y col., 1992; Kass y col., 1993; Goldschmidt y Hendrick, 2002).

Esta hipótesis fundamenta este trabajo de investigación.

Durante el proceso inflamatorio se producen múltiples mediadores químicos, muchos de ellos derivados del ácido araquidónico. El ácido araquidónico es liberado de la membrana plasmática por acción de la enzima fosfolipasa A₂. Luego de su liberación, el metabolismo de este ácido puede seguir dos vías preferenciales, la vía de la lipooxigenasa o la de la ciclooxigenasa. Esta última vía puede ser catalizada por dos variantes enzimáticas, la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2). COX-1 es constitutiva y está presente en la mayoría de los tejidos. COX-2 sólo es constitutiva en placenta, riñón y cerebro. Sin embargo, su expresión es inducida por múltiples estímulos tales como mediadores de la inflamación (interleuquina 1 [IL1], factor de necrosis tumoral alfa [TNF α], interferón gama [IFN γ]) o hipoxia (Espinosa y col, s/d; Williams y col., 1999; O'Byrne y Dalglish, 2001).

COX-2 fue hallada, y considerada de valor pronóstico, en tumores epiteliales humanos como cáncer de colon (Wang y Dubois, 2010) y de mama (Wolf y col., 2006). También, fue documentada su expresión en tumores humanos de origen mesenquimático, entre ellos sarcoma de Kaposi (Sharma-Walia y col., 2012), rhabdomyosarcomas (Carmody Soni y col., 2011), osteosarcomas (Xu y col., 2006; Rodríguez y col., 2008), condrosarcomas y sarcomas sinoviales (Carmody Soni y col., 2011). En algunos de estos, aunque no en todos, se pudo asociar el pronóstico con

la expresión de COX-2 (Xu y col., 2006; Wolf y col., 2006; Rodríguez y col., 2008; Wang y Dubois, 2010).

En medicina veterinaria, se demostró la expresión de COX-2 en diversas neoplasias caninas, tales como carcinomas de células escamosas, de células de transición, nasales, renales, prostáticos y colorrectales, melanomas y osteosarcomas (Khan y col., 2001; Lavallo y col., 2009; Barboza De Nardi y col., 2011; Bardagj y col., 2012). Además, esta enzima demostró tener valor pronóstico en tumores mamarios caninos (Lavallo y col., 2009). En felinos, se halló en carcinomas de células escamosas orales y en carcinomas de células de transición (Beam y col., 2003). Son escasas las comunicaciones que mencionan su presencia en SSI (Magi y col., 2010; Carneiro y col., 2018), incluso algunos autores fracasaron en su determinación en estas neoplasias (Beam y col., 2003).

La vía de COX-2 produce, luego de varios pasos intermedios, prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX). Entre ellos, la PGE2 resulta de particular interés por su rol en la patogenia de los procesos neoplásicos. Este mediador, inhibe la actividad de macrófagos y células *natural killers*, inhibe la apoptosis y estimula la síntesis del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF-2) que promueve la proliferación de células tumorales. A través de estos mecanismos, la PGE2 facilita la progresión neoplásica al impedir la eliminación de las células neoplásicas y favorecer su multiplicación. Además, FGF-2 estimula la multiplicación de células vasculares (Cha y DuBois, 2007; Greenhough y col., 2009).

La relación entre inflamación y cáncer como campo de estudio, cobra progresivamente mayor interés, es un área compleja en franco crecimiento. Este proyecto pretende lograr un aporte preliminar al conocimiento de la patogenia de los SSI en particular, así como a este campo en general. En este sentido, los SSI representan un modelo único para el estudio de la relación entre inflamación y carcinogénesis (Cannon, 2015).

Importancia de los factores de crecimiento PDGF y FGF en las neoplasias

Los mismos estímulos que inducen la expresión de COX-2 también estimulan la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Andrae y col., 2008). Este factor de crecimiento, al igual que FGF-2, estimula el crecimiento de células vasculares y neoplásicas (Dow y Vere White, 2000). Además, algunos estudios muestran que en células de tejido conectivo, la inducción de la síntesis de PGE₂ en respuesta a IL-1 requiere coestimulación con PDGF o factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Chiou y col., 1990; Chen y col., 1997).

Además, tanto PDGF como FGF-2 brindan retroalimentación positiva al estimular la síntesis y activación de fosfolipasa A₂ (Cha y DuBois, 2007; Chen y col., 1997), y la actividad y expresión de ciclooxigenasas (Habenicht y col., 1985; Cha y DuBois, 2007). Ambos factores de crecimiento fueron hallados en SSI (Hendrick, 1999; Nieto y col., 2003; Martano y col., 2011). Los receptores de ambos factores de crecimiento son receptores de superficie compuestos por tirosinquinasa. Los de PDGF son dímeros que

se forman por la combinación de dos monómeros α y β , que dan origen a tres tipos de receptores $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ y $\alpha\beta$. FGF posee cuatro tipos de receptores: 1, 2, 3 y 4. La familia de PDGF posee cinco miembros (AA, AB, BB, CC, DD) de los cuales solo BB estimula todos los tipos de receptores. FGF-2 es el prototipo de la familia FGF que posee veintitrés miembros (Cao y col., 2008).

Ambos factores de crecimiento se coexpresan frecuentemente en células tumorales y sus acciones son sinérgicas. Además, estimulan la expresión de sus receptores en forma recíproca. Ambos estimulan el crecimiento de células vasculares murales, aunque las células endoteliales solo se sensibilizan a la acción de PDGF luego de la estimulación con FGF-2 (Cao y col., 2008).

FGF-2 participa en la reparación tisular por su acción sobre las células del estroma. También, induce la proliferación de células tumorales, que en el caso de sarcomas corresponden a la misma estirpe celular (Nugent y Iozzo, 2000; Cao y col., 2008). PDGF también promueve la multiplicación de células estromales y neoplásicas. Por lo tanto, ambos factores promueven la proliferación celular y la angiogénesis en forma individual, pero este efecto se incrementa en forma sinérgica (Cao y col., 2008).

Potencialidades terapéuticas

La terapia con inhibidores de COX-2 mostró resultados favorables en medicina humana y veterinaria (Cha y DuBois, 2007; Wang y DuBois, 2010; Barboza De Nardi y col., 2011). En animales, los inhibidores de COX-2, han

demostrado efectos antineoplásicos en tumores caninos tales como carcinomas de células de transición y carcinomas orales de células escamosas, también se observaron resultados favorables tras su uso en el tratamiento de perros con pólipos rectales y con carcinomas mamarios inflamatorios (Barboza De Nardi y col., 2011).

Dada su coexpresión en tejidos neoplásicos y su acción sinérgica, las vías de señalización de FGF y PDGF serían blancos importantes para el desarrollo de tratamientos antineoplásicos, en particular en la terapia antiangiogénica del cáncer (Cao y col., 2008).

La desregulación de las tirosinquinasa es fundamental en la patogenia del cáncer. La terapia con inhibidores de tirosinquinasa transformó el enfoque terapéutico de una variedad de neoplasias malignas en medicina humana. Dentro de este grupo de drogas, el mesilato de imatinib, fue uno de los primeros fármacos antineoplásico que mostró resultados positivos en pacientes humanos (Iqbal e Iqbal, 2014). En este momento, el mesilato de imatinib está siendo evaluado para el tratamiento de neoplasias en medicina veterinaria. En un estudio preliminar, esta droga inhibió la actividad de PDGFR en líneas celulares felinas de SSI y el crecimiento de estos tumores en un xenoinjerto en modelo murino (Katayama y col., 2004).

Objetivos e hipótesis

Objetivo general

- ❖ Describir características morfológicas y moleculares de los SSI en felinos, en la República Argentina.

Objetivos particulares

- Caracterizar los distintos sarcomas que aparecen en sitios de inoculación en la población estudiada y establecer su frecuencia.
- Estudiar la expresión de COX-2, PDGF, FGF-2 y sus receptores, y su relación con índices de proliferación y vascularización.
- Estimar la relación entre los resultados obtenidos, aspectos clínicos, diagnóstico histopatológico y grado de anaplasia.

Hipótesis más relevantes

Dado que diversos autores describieron distintos tipos histológicos de SSI felinos, con una respuesta inflamatoria característica, de los cuales el hallado con mayor frecuencia fue el fibrosarcoma, y que se demostró la expresión de factores de crecimiento en estos tumores, se postulan las siguientes hipótesis:

- El sarcoma asociado a sitios de inoculación que se presenta con mayor frecuencia en gatos de la República Argentina es el fibrosarcoma.
- Los SSI felinos expresan COX-2 y su expresión tiene relación con la proliferación celular y la vascularización.
- La sobreexpresión de factores de crecimiento y sus receptores se relaciona con:
 - El incremento de la proliferación celular.
 - La vascularización.

Estudios histopatológicos y seguimiento clínico

Introducción

Como se mencionó en el capítulo I los SSI son neoplasias de origen mesenquimático que aparecen en sitios utilizados rutinariamente para la aplicación de vacunas u otros inóculos (Shaw y col., 2009).

Este capítulo aborda los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos necesarios para arribar al diagnóstico de cada caso, establecer su grado de anaplasia y de inflamación, y calcular el porcentaje de células proliferantes. Además, se detalla la información obtenida en relación al seguimiento clínico.

Los conceptos teóricos relevantes para este capítulo fueron desarrollados previamente (ver capítulo I).

Materiales y métodos

Para el presente trabajo se seleccionaron casos de archivo (bloques en parafina) de un laboratorio privado de histopatología que recibe muestras de todo el país (Laboratorio Duchene). Se realizó un muestreo consecutivo (Robledo Martín, 2005) tomando todos los casos que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión durante los años 2011 y 2012. Dichos criterios fueron:

1) Criterio de inclusión: se seleccionaron para su estudio todos los tumores diagnosticados como sarcomas posinoculación, en el período antes mencionado, quedando incluidos 185 casos.

2) Criterio de exclusión: los casos con características histológicas típicas, pero localización atípica o desconocida fueron excluidos. La muestra quedó finalmente conformada por 117 casos. De los cuales cuatro eran recidivas de otras neoplasias incluidas en el muestreo.

Estudios histopatológicos

Las muestras de tejido se recibieron fijadas en formol al 10% y se procesaron según la técnica histológica de rutina, incluidas en parafina, cortadas a 5 μm y coloreadas con hematoxilina y eosina. Posteriormente fueron examinadas con un microscopio óptico (CX31, Olympus, Japón).

Los sarcomas seleccionados fueron reclasificados siguiendo los criterios de clasificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud) para tumores mesenquimáticos de la piel y tejidos blandos (Hendrick y col., 1998). Se consideraron como fibrosarcomas aquellos tumores compuestos por haces o fascículos entrelazados de células fusiformes pleomórficas (fig. 5). En cambio, los que presentaron células fusiformes a estrelladas, de disposición laxa, inmersas en una matriz mucinosa, que adopta una tonalidad celeste con hematoxilina y eosina, fueron clasificados como mixosarcomas (fig. 6). Las neoplasias tradicionalmente llamadas histiocitomas fibrosos malignos (HFM), fueron denominadas sarcomas pleomórficos (Hendrick, 2017); para su clasificación se tuvo en cuenta la

presencia de abundantes células gigantes multinucleadas, células fusiformes y células histiocitoides atípicas (fig. 7). Aquellos que presentaron células pleomórficas con abundante citoplasma eosinofílico, células multinucleadas y células en raqueta (con prolongaciones citoplasmáticas) se clasificaron como rhabdomyosarcomas (fig. 8).

Dado que la OMS (Hendrick y col., 1998) no considera dentro de las neoplasias de tejidos blandos aquellas que forman matriz condroide u osteoide se recurrió a otros criterios presentes en la bibliografía, tanto de medicina humana (Sangüesa Nebot y col., 2007) como veterinaria (Thompson y Dittmer, 2017), para su clasificación. Por ello, se consideraron osteosarcomas extraesqueléticos aquellos que forman matriz osteoide, aunque puedan también formar matriz condroide (Thompson y Pool, 2002). Dado que existen comunicaciones que mencionan la posibilidad de ocurrencia de metaplasia osteoide y condroide en neoplasias de tejidos blandos (Thompson y Dittmer, 2017), se consideraron criterios adicionales para diferenciar fibrosarcomas con diferenciación condroide y osteoide de osteosarcomas extraesqueléticos. Se tuvo en cuenta la extensión y diferenciación del tejido osteoide y condroide. Aquellos con patrón predominante de haces entrelazados de células fusiformes pleomórficas y que, además, presentaron tejido condroide y osteoide, o solo osteoide, diferenciado y en menos del 50% de la extensión de la muestra, se consideraron fibrosarcomas con metaplasia ósea (fig. 9). Aquellos que presentaron tejido osteoide con diferenciación moderada a pobre, y que se

extiende en más del 50% de la muestra se consideraron osteosarcomas extraesqueléticos (fig. 10).

El grado de anaplasia (GA) se determinó utilizando un esquema propuesto por Couto y col. (2002) que toma en cuenta la diferenciación celular, el índice mitótico (IM) y el grado de necrosis (tabla 1). De la combinación de dichas características surge la puntuación que permite clasificar las neoplasias en tres grados (tabla 2).

Para establecer el puntaje correspondiente al grado de diferenciación celular se consideraron los siguientes criterios: se asignó un punto a los tumores cuyas células eran similares a las diferenciadas, dos puntos si sus células presentaban fenotipo histológico definido, y finalmente, se asignaron tres puntos a aquellos con células pobremente diferenciadas (Couto y col., 2002) (tabla 1).

El IM se estableció obteniendo el promedio de mitosis en diez campos con un objetivo de 40X, se utilizó un microscopio de campo amplio (Objetivo PLAN C 40X corrección al infinito 0.65 NAX Olympus). Se excluyeron sectores con extensas áreas de inflamación y necrosis. El puntaje que se atribuyó a los sarcomas respetó el siguiente esquema: un punto para IM entre 1 y 9, dos puntos para IM entre 10 y 19, y tres puntos para IM ≥ 20 (Couto y col., 2002) (tabla 1).

En cuanto al grado de necrosis, se computó un punto cuando se verificó ausencia de necrosis, dos puntos cuando la necrosis representó menos del

50% del área de la muestra, y tres puntos cuando fue mayor al 50% de su área (Couto y col., 2002) (tabla 1).

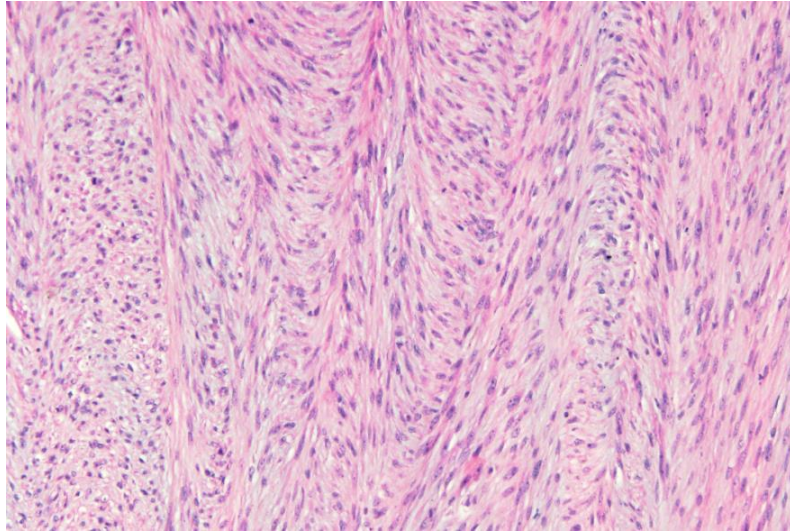


Figura 5. Fibrosarcoma. Se observa el patrón característico de haces o fascículos entrelazados de células fusiformes pleomórficas. H&E 10X.

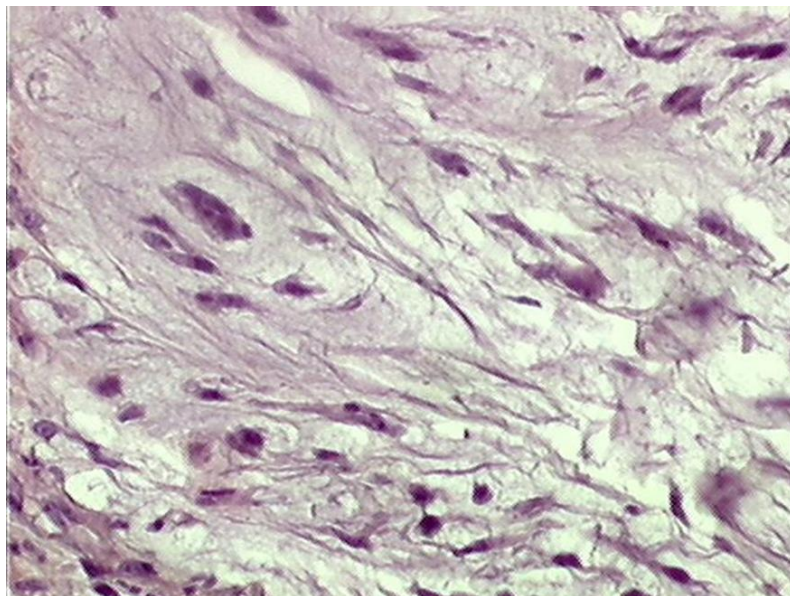


Figura 6. Mixosarcoma. Se observa la presencia de células fusiformes a estrelladas, de disposición laxa, inmersas en una matriz mucinosa. H&E 20X.

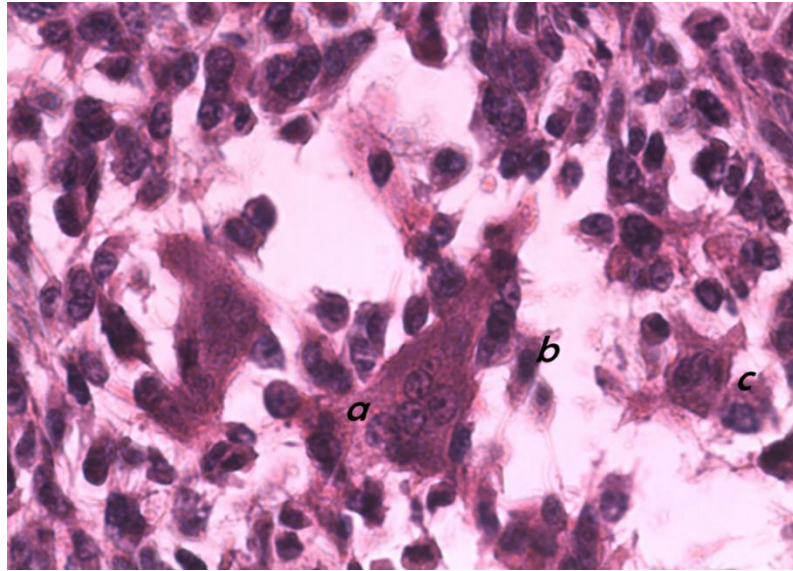


Figura 7. Sarcoma pleomórfico (Hendrick, 2017) (tradicionalmente denominado HFM). Se observan abundantes células gigantes multinucleadas (a), células fusiformes (b) y células histiocitoides atípicas (c). H&E 40X.

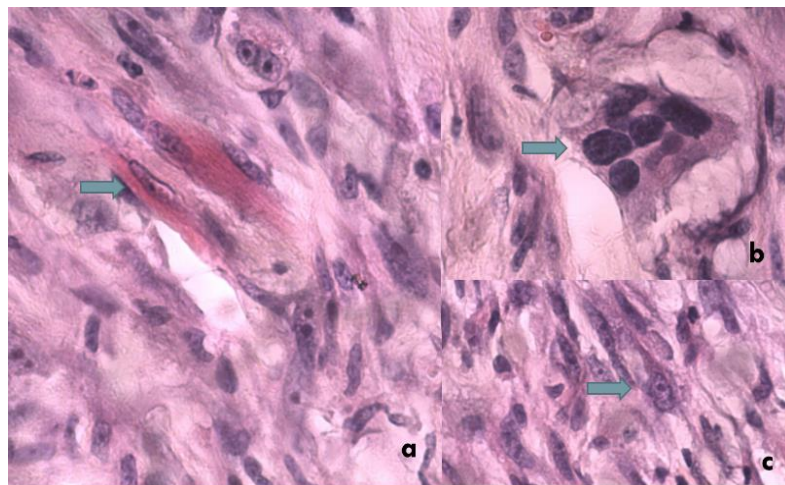


Figura 8. Sarcoma inicialmente diagnosticado como rhabdomiosarcoma. Se observan: células pleomórficas con abundante citoplasma eosinofílico (imagen a, flecha), células multinucleadas (imagen b, flecha) y células en raqueta (con prolongaciones citoplasmáticas) (imagen c, flecha). H&E 40X.

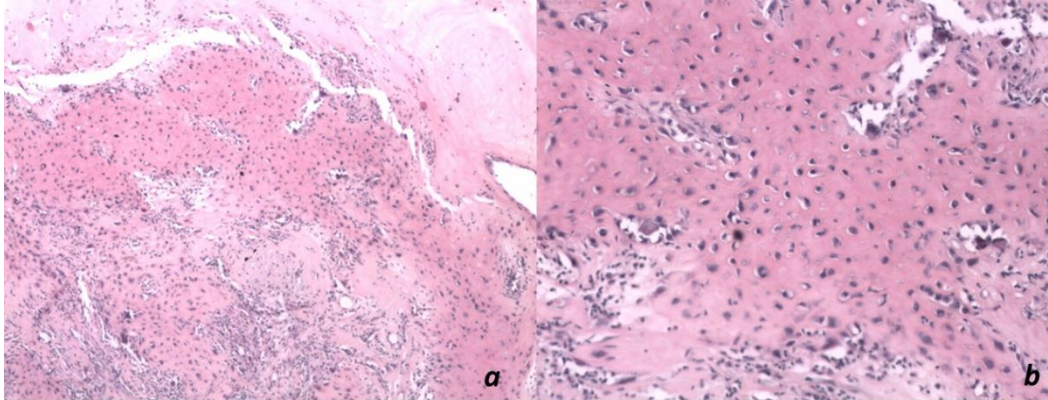


Figura 9. Fibrosarcoma con metaplasia ósea. En las imágenes a y b se observa tejido osteoide diferenciado, que se halló en menos del 50% de la extensión de la muestra. H&E 4 X y 10X (respectivamente).

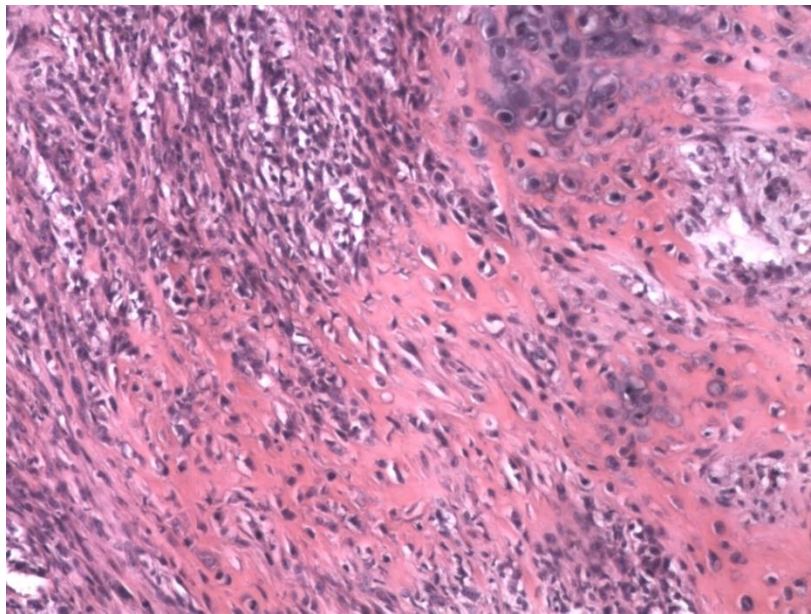


Figura 10. Osteosarcoma extraesquelético. En la imagen se observa tejido osteoide y condroide con diferenciación moderada a pobre. H&E 10X.

Tabla 1. Criterios para asignación de puntaje para la determinación del grado de anaplasia en SSI (Couto y col., 2002).

| Criterios | Puntuación |
|----------------|--|
| Diferenciación | 1: células similares a las del tejido de origen. 2: células con fenotipo histológico definido. 3: células pobremente diferenciadas. |
| IM | 1: 1-9 figuras mitóticas/10 campos a 40X. 2: 10-19 figuras mitóticas/10 campos a 40X. 3: 20 o más figuras mitóticas/10 campos a 40X. |
| Necrosis | 1: ausencia de necrosis. 2: necrosis menor al 50% del área total. 3: necrosis mayor al 50% del área total. |

Tabla 2. Grado de anaplasia (Couto y col., 2002).

| Grado de anaplasia | Puntaje |
|--------------------|---------|
| Grado I | 3-4 |
| Grado II | 5-6 |
| Grado III | 7-9 |

La suma de los puntajes obtenidos para cada criterio constituye el puntaje final en función del cual se atribuye a cada neoplasia uno de tres grados de anaplasia (tabla 2) (Couto y col., 2002).

El grado de inflamación (GI) se estableció al evaluar el infiltrado linfoide peritumoral a una magnificación de 4X según criterios adaptados a partir

de los utilizados por Couto y col. (2002): 0=ausencia de infiltrado linfoide peritumoral, 1=escaso infiltrado linfoide (requiere búsqueda cuidadosa), 2=infiltrado difuso o pequeños agregados en menos del 50% de los campos, y 3=agregados linfoides en el 50% de los campos o más. En este caso, se excluyó uno de los tacos de la población seleccionada ya que por ser una muestra mínima (biopsia incisional) el área peritumoral, en la que se centra la evaluación, no resultaba representativa.

Estudios inmunohistoquímicos

Se realizaron estudios inmunohistoquímicos para confirmar la estirpe celular que originó las neoplasias, para ello se utilizaron como anticuerpos primarios pancitoqueratina (Anti-cytokeratin, Dako, Carpinteria, California) y vimentina (Vimentin RTU-VIM-V9, Leica Biosystems, Newcastle). Además, se seleccionaron 10 sarcomas al azar a los que se les realizó inmunomarcación con anticuerpo anti-desmina (Desmin RTU-DES-DERII, Leica Biosystems, Newcastle). Aquellos casos que lo requirieron fueron sometidos a otras pruebas inmunohistoquímicas para confirmar su diagnóstico histopatológico. Los anticuerpos utilizados en estos casos fueron anti-desmina y anti- α -actina de músculo liso (anti- α -actina, [ab7817] Abcam, Cambridge).

También, se realizó la inmunomarcación con anti-PCNA (anti-PCNA clone PC 10, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) para establecer del porcentaje de células proliferantes. Para ello, se seleccionó una muestra de 54 casos tomados al azar.

Para la técnica inmunohistoquímica se realizaron cortes de 3 μm de espesor que se montaron sobre vidrios positivados (HistoSystem, Rosario, Argentina). Estos se desparafinaron, rehidrataron e incubaron con H_2O_2 en metanol al 3%, para inhibir las peroxidases endógenas, durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron con solución *buffer*-fosfato (PBS, pH 7,4). La recuperación antigénica se realizó en dos ciclos en microondas a 800 W, de 3 minutos cada uno, en *buffer*-citrato, pH 6,0. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon al incubar los cortes con albúmina sérica bovina (BSA) al 1%, durante 30 minutos a temperatura ambiente, en cámara húmeda. La incubación con anticuerpos primarios policlonales (pancitoqueratina dilución 1:500; PCNA dilución 1:3000) y monoclonales anti- α -actina de músculo liso dilución 1:200, desmina y vimentina RTU) se realizó en cámara húmeda durante una noche a 4° C, y fue seguida por la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo (EnVision HRP ®, DakoCytomation, Carpinteria, California) para los anticuerpos policlonales, y anti-ratón (EnVision HRP ®, DakoCytomation, Carpinteria, California) para los anticuerpos monoclonales, en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como control negativo de anticuerpo se reemplazó el anticuerpo por PBS, pH 7,4. Como control negativo de tejido se utilizó intestino delgado de gato (tejidos diferentes a epitelio para pancitoqueratina, a tejido conjuntivo para vimentina, a epitelio de las criptas para PCNA, a músculo liso para desmina y α -actina de músculo liso). Además, de los controles negativos internos que representan los tejidos no neoplásicos de cada muestra. Como control positivo se utilizó intestino

delgado de gato: epitelio para pancitoqueratina, tejido conjuntivo para vimentina, epitelio de las criptas para PCNA, músculo liso para desmina y α -actina de músculo liso. Se utilizó Tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) y hematoxilina como coloración de contraste.

La inmunomarcación con anti-PCNA se evaluó estimando el porcentaje de células con marcación nuclear positiva (porcentaje de células proliferantes) al contar estas sobre imágenes digitales tomadas en diez campos a 40X. Las imágenes se capturaron mediante una cámara de video digital (Exwave HAD, Sony) montada sobre un microscopio trinocular (CX31, Olympus, Japón) y conectada a una computadora que cuenta con un programa informático de análisis de imágenes digitales (ImagePro Plus v6.3 - Media Cybernetics, Rockville).

Seguimiento clínico

Las unidades de observación utilizadas corresponden a los Médicos Veterinarios remitentes y protocolos de remisión de muestras para obtener información de la historia clínica y evolución. Las variables consideradas fueron:

- 1) parámetros demográficos: raza y sexo;
- 2) parámetros clínicos: edad al momento del diagnóstico, ocurrencia de recidivas, tiempo promedio entre recidivas y sobrevida. Además, se consideró la ubicación anatómica de las neoplasias.

Las técnicas de recolección de la información fueron las siguientes: los parámetros demográficos y la ubicación anatómica se extrajeron de la información enviada por los profesionales remitentes junto con la muestra (protocolos de remisión de muestra). Para la recolección de información comprendida en los parámetros clínicos se diseñó una encuesta (anexo I) que se envió por correo electrónico¹ a los médicos remitentes para obtener la información clínica pertinente, aquellos que no respondieron a la encuesta enviada por correo electrónico fueron contactados por vía telefónica y se les realizó por este medio la misma encuesta. Con posterioridad, se envió nuevamente la encuesta a aquellos que no aportaron información en las anteriores oportunidades.

1-Los 117 casos estudiados provienen de 74 remitentes, con un promedio de 1,58 casos por remitente. Entre ellos, se encuentran profesionales particulares y laboratorios. De los 8 laboratorios remitentes, sólo uno accedió a compartir la información de contacto de sus clientes (15 en total). Esto, transforma el total de remitentes en 88, de los cuales 7 corresponden a laboratorios que no tuvieron interés en participar, uno corresponde a un establecimiento que ya no existe y 4 son remitentes de los cuales no se conoce un contacto registrado. Por lo expuesto, la población a encuestar queda conformada por 76 profesionales (incluyendo los 15 contactos aportados por uno de los laboratorios), que fueron contactados por correo electrónico en tres oportunidades (inicialmente, con un intervalo de una semana entre el primer y el segundo correo, y de dos semanas entre el segundo y el tercero). Los que no respondieron a este primer contacto, fueron contactados por teléfono (muchos solicitaron que se les reenviara la encuesta por correo nuevamente y así se hizo). Como resultado se obtuvieron 27 respuestas: 2 manifestaron que no tenían información registrada, uno que no tenía interés en brindar información y 24 respondieron total o parcialmente la encuesta (por correo electrónico o por teléfono). En 2018 se envió nuevamente la encuesta a aquellos que no respondieron en las ocasiones anteriores, sin éxito.

Análisis estadístico

Para el presente trabajo se optó por la perspectiva Bayesiana por ser una metodología sensible, robusta y desprovista de las limitaciones propias del trabajo con tamaños muestrales pequeños y desiguales. Es por ello que puede pensarse como un camino alternativo a las clásicas pruebas frecuentistas (Bolstad, 2007).

Para evaluar la asociación entre las variables GA y GI se realizó una prueba de correlación bayesiana (matriz de correlación bayesiana). Para ello, se desarrollaron scripts en lenguaje R (<https://cran.r-project.org/>) y WinBUGS (<https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-winbugs>), utilizando la interface del lenguaje R, R2WinBUGS (<https://cran.r-project.org/web/packages/R2WinBUGS/index.html>). Se partió de una distribución *prior* no informativa, se corrieron 10000 iteraciones del modelo, descartando las primeras 1000 (Risso y Risso, 2017).

Para evaluar la asociación entre las variables GA, GI, sexo, edad (informada al remitir la muestra), ubicación anatómica, edad al momento del diagnóstico (encuesta), existencia de recidivas, tiempo promedio entre recidivas, número de recidivas, tiempo de sobrevida y porcentaje de células proliferantes. La metodología de correlación bayesiana se aplicó mediante el uso de software JASP (<https://jasp-stats.org/>).

Para todos los casos, los datos numéricos discretos, se analizaron usando un modelo transformación a raíz cuadrada, los datos expresados como proporciones se analizaron usando un modelo transformación arcoseno. Para todo el estudio se fijó un nivel de significación $P \leq 0,05$.

Resultados

Estudios histopatológicos

La distribución de los diferentes tipos morfológicos se muestra en la tabla 3. De los 117 SSI estudiados el 29,91% presentó GA I, el 64,10% GA II y el 5,98% GA III (tabla 4). Tres de las recidivas presentaron el mismo GA (GA II) que el tumor primario y una de ellas presentó menor GA (GA I) que aquel. Respecto al GI, se asignó grado 1 al 15,52%, grado 2 al 36,21% y grado 3 al 48,27% de ellos (tabla 5). En este caso tres de las recidivas presentaron el mismo grado de inflamación que su tumor primario, en todos los casos grado 3, y una de ellas presentó un grado de inflamación menor (grado 1) que su tumor primario que presentó grado 2.

Tabla 3. Resultados de estudios histopatológicos (n=117)

| % | Tipo | Grado de anaplasia | % |
|-------|-------------------------------|--------------------|-------|
| 87,18 | Fibrosarcoma ⁽¹⁾ | I | 27,45 |
| | | II | 67,65 |
| | | III | 4,9 |
| 1,71 | Osteosarcoma extraesquelético | I | 50 |
| | | II | 50 |
| | | III | 0 |
| 5,98 | Mixosarcoma | I | 71,43 |
| | | II | 14,28 |
| | | III | 14,28 |
| 3,42 | Sarcoma pleomórfico o HFM | I | 0 |
| | | II | 25 |
| | | III | 75 |
| 1,71 | Rabdomiosarcoma | I | 50 |
| | | II | 50 |
| | | III | 0 |

(1) Ocho de ellos presentaron metaplasia osteoide.

Tabla 4. Distribución de SSI de acuerdo a su grado de anaplasia (GA)
(n=117)

| Grado de anaplasia | % de casos |
|--------------------|------------|
| I | 29,91 |
| II | 64,10 |
| III | 5,98 |

Tabla 5. Distribución de SSI de acuerdo a su grado de inflamación (GI)
(n=116)

| Grado de inflamación | % de casos |
|----------------------|------------|
| 0 | 0 |
| 1 | 15,52 |
| 2 | 36,21 |
| 3 | 48,27 |

Estudios inmunohistoquímicos

Todos los sarcomas resultaron negativos para pancitoqueratina (fig. 11 y 12) y positivos para vimentina (fig. 13 y 14). Los 10 sarcomas, seleccionados al azar, en los cuales se evaluó la expresión de desmina resultaron negativos (fig. 15). Los dos SSI que habían sido clasificados preliminarmente como rabdiosarcomas resultaron negativos para desmina (fig. 16) y como consecuencia se reclasificaron como fibrosarcomas.

Los cuatro clasificados inicialmente como sarcomas pleomórficos (anteriormente denominados HFM) resultaron positivos para α -actina de músculo liso (fig. 17) y negativos para desmina (fig. 18), esto justificó conservar el diagnóstico original.

La clasificación de los SSI teniendo en cuenta los resultados inmunohistoquímicos se muestran en la tabla 6.

El porcentaje de células proliferantes (fig. 19) alcanzó un promedio de 50,12% de núcleos positivos con puntos extremos de 10,59% y 89%.

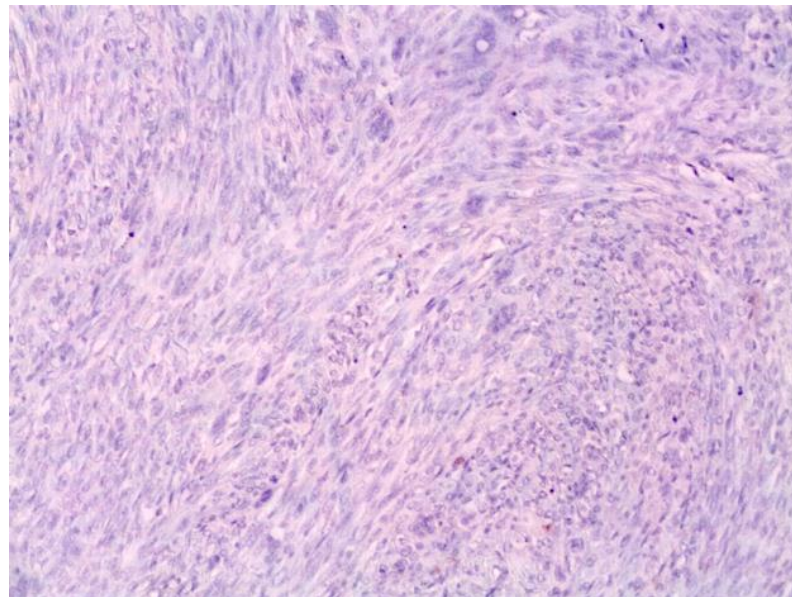


Figura 11. Fibrosarcoma. Se observa marca negativa para pancitoqueratina. DAB y hematoxilina 10X.

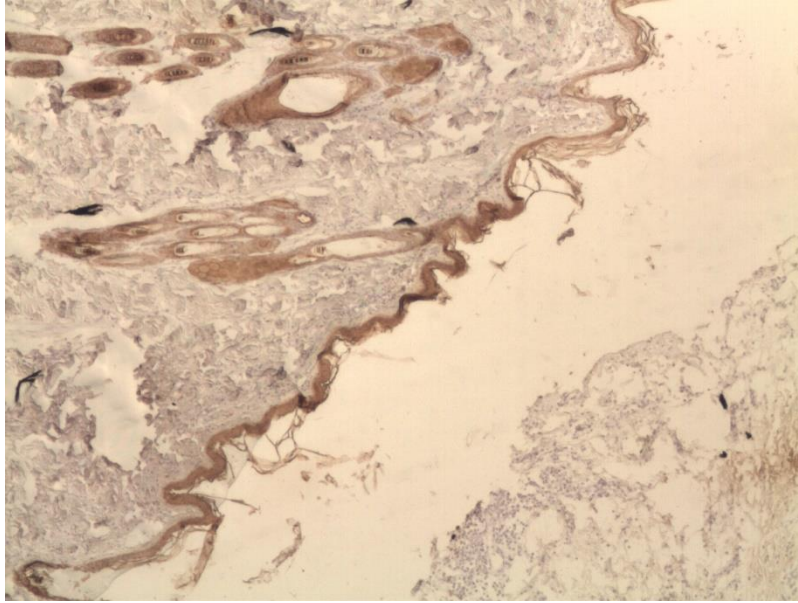


Figura 12. Piel adyacente al fibrosarcoma de la imagen anterior. Se observa marca positiva para pancitoqueratina en epidermis y folículos pilosos. DAB y hematoxilina 4X.

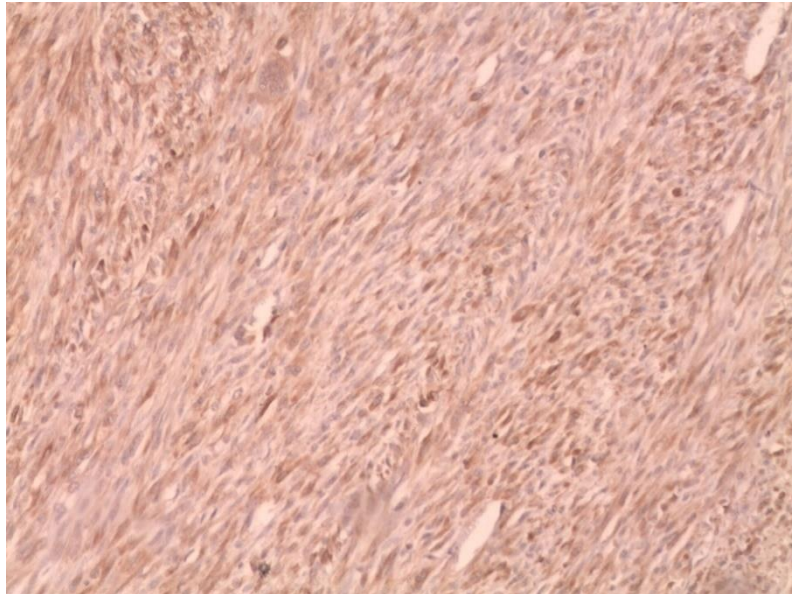


Figura 13. Fibrosarcoma. Se observa marca positiva para vimentina. DAB y hematoxilina 10X.

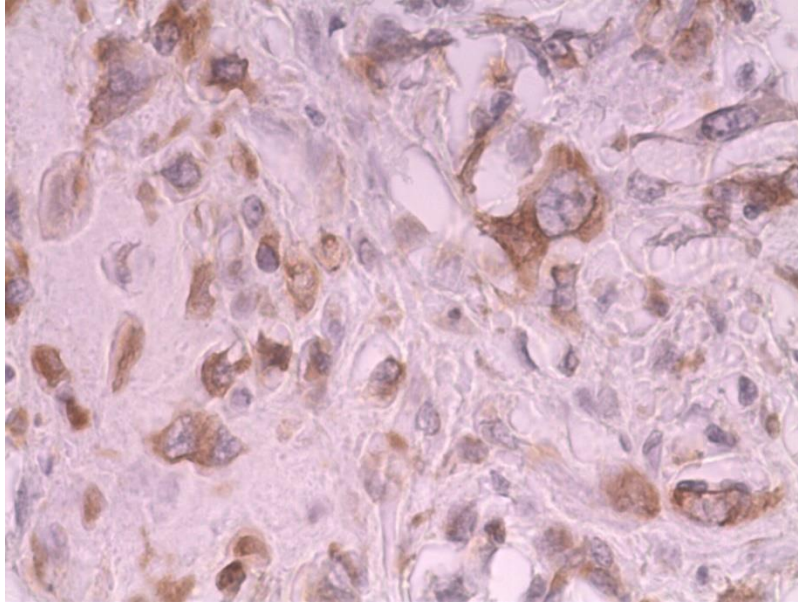


Figura 14. Fibrosarcoma. Se observa marca positiva para vimentina. DAB y hematoxilina 40X.

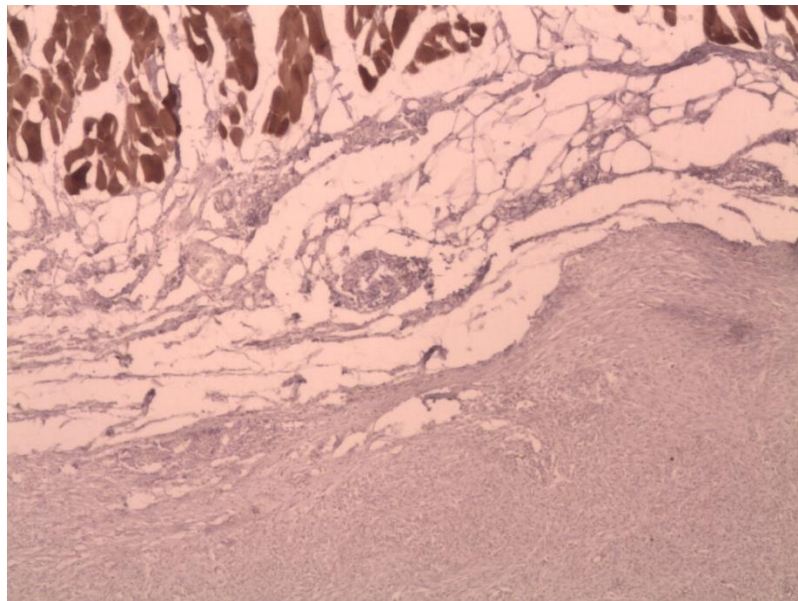


Figura 15. Fibrosarcoma. Se observa marca positiva para desmina en el músculo esquelético y negativa en el tumor. DAB y hematoxilina 4X.

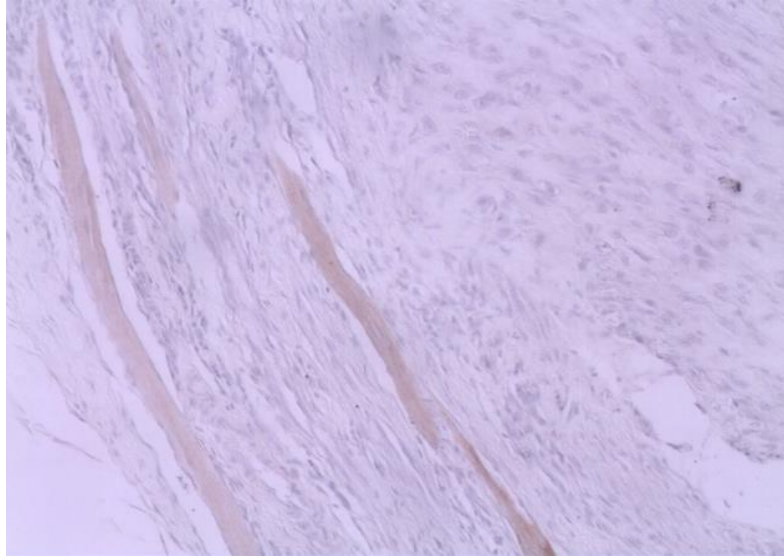


Figura 16. Sarcoma clasificado inicialmente como rhabdomyosarcoma. Se observa la positividad del músculo estriado para desmina en contraste con el tejido neoplásico negativo. Este resultado motivó su reclasificación como fibrosarcoma. DAB y hematoxilina 10X.

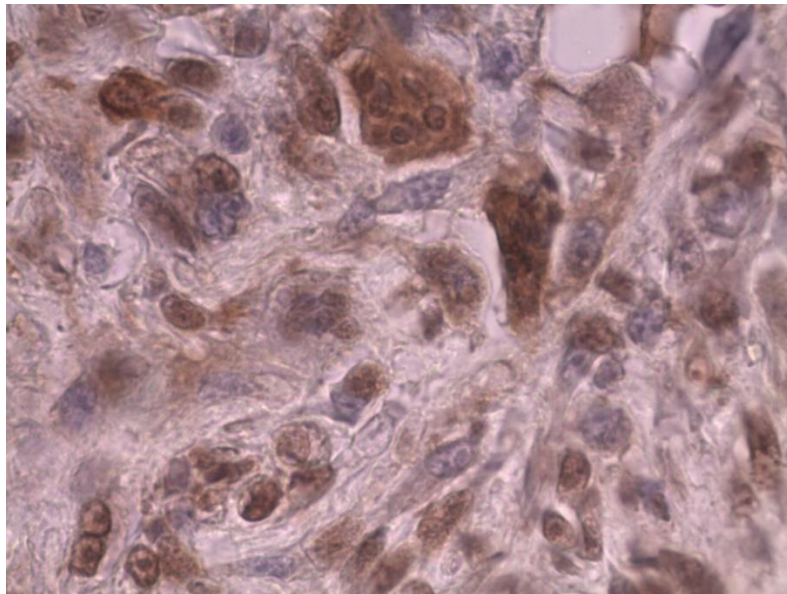


Figura 17. Sarcoma pleomórfico (Hendrick, 2017). Se observa inmunomarcación positiva para alfa-actina de músculo liso. DAB y hematoxilina 40X.

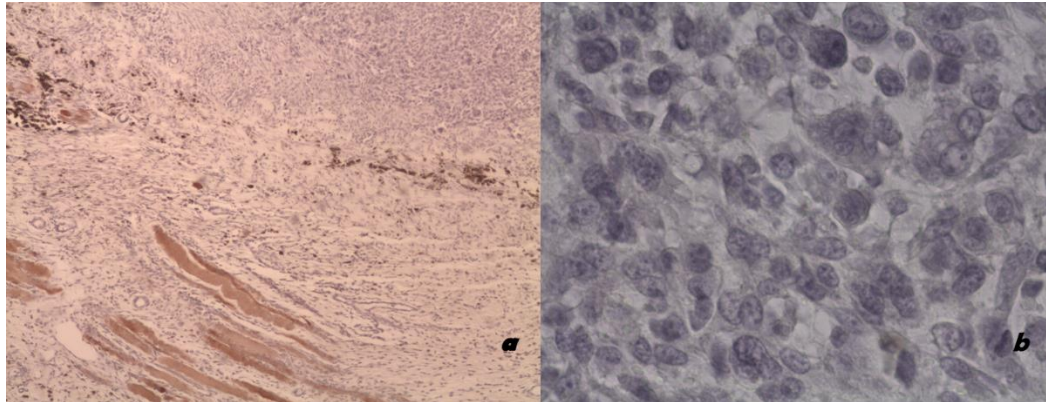


Figura 18. Sarcoma pleomórfico (Hendrick, 2017). Se observa inmunomarcación con anticuerpo anti-desmina. a) Músculo esquelético adyacente con marcación positiva, 4X. b) Células neoplásicas negativas para desmina, 40X. a y b) DAB y hematoxilina.

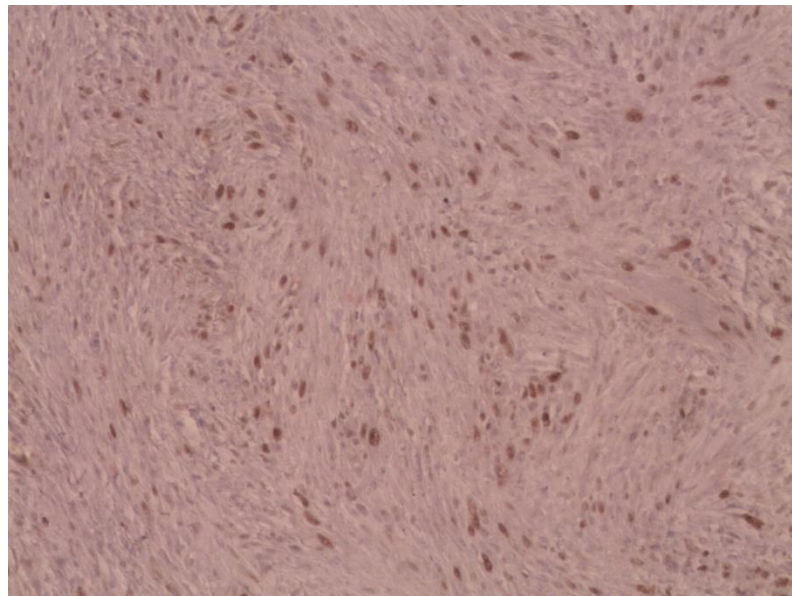


Figura 19. Inmunomarcación positiva nuclear para PCNA. DAB y hematoxilina 10X.

Tabla 6. Reclasificación de los sarcomas según los resultados inmunohistoquímicos (n=117)

| % | Tipo | Grado de anaplasia | % |
|-------|-------------------------------|--------------------|-------|
| 88,89 | Fibrosarcoma ⁽¹⁾ | I | 27,88 |
| | | II | 67,30 |
| | | III | 4,81 |
| 1,71 | Osteosarcoma extraesquelético | I | 50 |
| | | II | 50 |
| | | III | 0 |
| 5,98 | Mixosarcoma | I | 71,43 |
| | | II | 14,28 |
| | | III | 14,28 |
| 3,42 | Sarcoma pleomórfico o HFM | I | 0 |
| | | II | 25 |
| | | III | 75 |

(1) Ocho de ellos presentaron metaplasia osteoide.

Seguimiento clínico

Se obtuvieron veinticuatro respuestas efectivas (tabla 7) que permitieron conocer la evolución de la enfermedad en los casos informados.

Tabla 7. Información clínica aportada por médicos veterinarios remitentes

| Edad al momento del diagnóstico clínico en años | ¿Recidivó? Sí/No | Número de Recidivas | Tiempo promedio entre recidivas en días | Sobrevive Sí/No | Tiempo de sobrevida en días |
|--|---------------------|---------------------------|--|--------------------|-----------------------------------|
| 3,5 | Sí | 2 | 168 | D | D |
| 9 | D | D | D | D | D |
| 13 | Sí | 1 | 365 | No | 545 |
| 13,5 | Sí | 5 | 342 | No | 1945 |
| 6 | Sí | 2 | 360 | No | 910 |
| 10,5 | Sí | 2 | D | D | D |
| 5,5 | Si | 1 | 360 | No | 545 |
| 9 | Si | 1 | D | No | 450 |
| 7,67 | Si | 1 | 180 | No | 635 |
| 15 | Si | 1 | 540 | No | 1945 |
| 14 | No | 0 | - | No | 120 |
| 9 | Si | 1 | 274 | No | 635 |
| D | D | D | D | No | 365 |
| 16 | D | D | D | No | 270 |
| 15 | Sí | 3 | 340 | D | D |
| 12,5 | Sí | 1 | 240 | No | D |
| 9 | No | 0 | - | D | D |
| 7,67 | No | 0 | - | D | D |
| 12 | Sí | 3 | 281,4 | No | 1215 |
| 5 | Sí | 2 | 267 | No | 730 |
| D | Sí | 2 | D | No | D |
| 8 | Sí | 2 | 135 | No | 270 |
| 6 | Sí | 2 | 255 | No | 665 |
| 12 | Sí | 1 | 180 | No | 365 |

D: dato desconocido.

En relación con la raza de los felinos involucrados el 58,12%, de 117 casos fueron informados como mestizos o común europeo, el 4,27% fueron siameses, y de 44 (37,61%) no se dispone de información. El 46% (n=117) fueron hembras, el 50,43% fueron machos y se desconoce el sexo de 4 animales (3,42%).

La ubicación anatómica más frecuente fue la parrilla costal (51,28%), seguida del flanco (24,79%). Otros sitios menos frecuentes de aparición fueron la región dorsolumbar (16,24%), el cuello y la zona interescapular (3,42% cada uno). Solo se informó un caso de SSI en el muslo (0,85%).

Veintidós profesionales informaron la edad del animal al momento del diagnóstico, de estos datos se obtuvo un promedio de 9,95 años² (9 años y 11 meses). Si consideramos la edad informada al momento de remitir la muestra, de los 117 casos 14 no brindan ese dato, el promedio de los 103 restantes es de 8,86 años (8 años y 10 meses).

En relación con la ocurrencia de recidivas, de los 24 SSI informados 18 recidivaron (75%), con un promedio de 1,8 recidivas y extremos entre 1 y 5 recidivas; 3 no recidivaron (12,5%) y de 3 se desconoce si hubo o no recidiva (12,5%). Se obtuvo información sobre el tiempo entre recidivas de 15 de los casos informados, el promedio fue de 285,83 días con extremos de 120 y 540 días. Para ocho casos (33,34%) se informó solo una recidiva,

2- Si bien es más correcto expresar la edad en años y meses, la bibliografía sobre el tema lo hace en formato decimal. Por este motivo, dada la necesidad de contar con datos comparables con los antecedentes y que no sería ético modificar la información presentada por otros autores, es que se decidió presentar la edad en ambos formatos (años y meses, y decimal).

en diez casos (41,67%) se informó más de una recidiva. Seis tumores (25%) recidivaron por primera (o única) vez dentro de los 6 meses, 4 de ellos recidivaron más de una vez dentro de un período de 2 años (16,67%). No se indagó sobre la confirmación histopatológica de las recidivas informadas, solamente en cuatro casos dispusimos del tumor primario y su posible recidiva. En esos casos se confirmó que se trató de recidivas. Para estas neoplasias, el tiempo promedio entre recidivas, obtenido a partir de las fechas de recepción de las muestras presentes en los protocolos de remisión de muestras, fue de 264,5 días con extremos de 155 y 375 días.

Respecto al tiempo de supervivencia se obtuvo un promedio de 725,62 días (resultado obtenido a partir de 16 casos en los que se informó este tiempo), los extremos se ubicaron en los 120 y 1945 días. En solo tres casos se informó evidencia de metástasis. Uno de ellos presentó masas cutáneas múltiples, otra afección del sistema respiratorio y en el restante se detectó una masa intestinal, ninguno de los casos cuenta con confirmación histopatológica. La causa de muerte informada fue: eutanasia en 10 casos, deterioro general en 2, insuficiencia renal en 3 y posible metástasis en sistema respiratorio en uno. En 8 casos se desconoce la causa de la muerte.

Solo dos de los médicos veterinarios informaron haber realizado cirugía radical, de ellos solo uno cuenta con información sobre la evolución del paciente. Este último, informa que el paciente sufrió una recidiva y luego de un tratamiento quirúrgico agresivo en el que se extirpó, junto con la masa,

pared costal y abdominal, permaneció libre de tumor hasta su muerte por insuficiencia renal. El tiempo de sobrevida en este caso fue de 1945 días.

Cuando se consultó a los profesionales por la posibilidad de vacunación en el sitio de aparición de la neoplasia en cuestión, 5 respondieron que con certeza recibieron la aplicación de vacunas en ese sitio y 15 que existía la posibilidad de vacunación en el sitio. Cuando se los consultó sobre la vacunación antirrábica (específicamente), 4 manifestaron certeza de vacunación antirrábica en el sitio y 16 que existía esa posibilidad. De los restantes casos, 4 en total, los médicos actuantes no pudieron informar sobre antecedentes de vacunación argumentando que el caso era atendido por otros colegas previamente al diagnóstico del tumor y que recibieron el caso por derivación.

Análisis estadístico

No hubo asociación estadísticamente significativa entre las variables GA y GI ($P = 0,203$) (Anexo II, tabla a). Tampoco hubo asociación entre las variables GA (Anexo II, tabla b) y GI (Anexo II, tabla c) con sexo, edad (al momento de remisión de la muestra), ubicación anatómica, edad al momento del diagnóstico (informado en encuesta), existencia de recidivas, tiempo promedio entre recidivas en días, número de recidivas y tiempo de sobrevida. Del mismo modo, no se halló asociación entre el porcentaje de células proliferantes y el sexo, la ubicación anatómica, el GI, la existencia de recidivas, el tiempo promedio entre recidivas y el tiempo de sobrevida (Anexo II, tabla d).

Se halló asociación estadísticamente significativa entre el porcentaje de células proliferantes y las siguientes variables: GA ($P=0,037$), edad al momento del diagnóstico ($P=0,02$), edad informada al momento de remisión de la muestra ($P=0,01$) y número de recidivas ($P=0,026$) (Anexo II, tabla d).

También, se demostró correlación significativa directa entre: edad al momento del diagnóstico y tiempo promedio entre recidivas ($P=0,046$), tiempo promedio entre recidivas y tiempo de supervivencia ($P=0,006$), número de recidivas y tiempo de supervivencia ($P=0,007$) (Anexo II, tabla e).

No se evaluó la asociación entre el porcentaje de células proliferantes y raza debido a que todos los animales de los que se conoció la raza y a los que se realizó inmunomarcación con anticuerpo anti-PCNA son gatos mestizos (Varianza=0, tabla 12) (Anexo II, tabla d); en cinco casos no se informó ese dato.

Discusión

El fibrosarcoma es el SSI más frecuente en la República Argentina, esto resulta similar a lo descrito en otros países (Estados Unidos de Norteamérica, España, Italia, Canadá) (Hendrick, 1999; Nieto y col., 2003; Martano y col., 2011; Wilcock y col., 2012). También, se encontraron en menor proporción otros tumores como: sarcomas pleomórficos (HFM), osteosarcomas extraesqueléticos y mixosarcomas.

Según Hendrick (2017), los sarcomas pleomórficos o HFM poseen un fenotipo fibroblástico/miofibroblástico: positivo a vimentina, y con

positividad variable para actina y desmina. En este estudio los resultados inmunohistoquímicos de estos SSI (positivos para vimentina y α -actina de músculo liso, y negativos para desmina) fueron compatibles con el fenotipo descrito por Hendrick (2017), por este motivo se confirmó su diagnóstico.

En relación al grado de anaplasia de los SSI, al igual que lo informado por Couto y col. (2002) y Nieto y col. (2003), las neoplasias de GA II fueron las más numerosas. Tres de las recidivas presentaron el mismo GA (DA II) que el tumor primario y una de ellas presentó un GA menor (GA I). Acorde a lo expuesto por Couto y col. (2002), la distribución en GA fue similar para los tumores primarios y para las recidivas, dado que el GAII es el más frecuente tanto en unos como en otros.

Con respecto al GI, la mayoría de los sarcomas fueron de grado 3. En este caso, tres de las recidivas presentaron el mismo GI que el tumor primario (GI 3) y una de ellas tuvo un GI menor que el tumor primario que presentó GI 2. Esta información concuerda con la presentada por Couto y col. (2002) que manifiestan que la mayoría de las neoplasias presenta abundante inflamación, tanto en el caso de los tumores primarios como de las recidivas. No se halló asociación entre GA y GI, tal como ocurrió en trabajos previos (Couto y col., 2002).

El promedio de edad al momento del diagnóstico, hallado en el presente estudio, es mayor (9,95 años -9 años y 11 meses en las encuestas-; 8,86 años -8 años y 10 meses en los protocolos de remisión de muestras-) al informado por otros autores (8,1 años) (Hendrick y col., 1994; Goldschmidt y Hendrick, 2002) tanto si consideramos la información obtenida a partir de

encuestas como la obtenida de los protocolos de remisión de muestras. Incluso, el promedio obtenido de las encuestas, es mayor que el informado para NSSI (9,2 años) (Hendrick y col., 1994; Goldschmidt y Hendrick, 2002). Esto podría deberse a que la consulta en nuestro medio se retrasa en comparación con lo que ocurre en países del primer mundo. Solo tres profesionales informaron haber hallado evidencia de metástasis, los sarcomas implicados en esos casos fueron clasificados como fibrosarcomas Grado I y II. Sin embargo, de ninguno de ellos puede asegurarse el diagnóstico porque no cuentan con confirmación histopatológica.

Los sarcomas estudiados presentaron alta recurrencia. Esto concuerda con lo comunicado por Hendrick (1999). Sin embargo, sólo un tercio lo hizo dentro de los seis meses, que es el período en el que este autor ubica la mayoría de las primeras recidivas (Hendrick, 1999) y solo el 16,67% de los casos presentaron más de una recidiva en un período de dos años, porcentaje muy inferior al mencionado por Hendrick (1999) (22%). Es necesario considerar que sólo cinco (20,84% de los veinticuatro casos, con información sobre seguimiento clínico, y el 31% de los dieciséis con información sobre tiempo de sobrevida) alcanzaron los dos años de sobrevida (730 días). Al igual que informaron otros autores (Martano y col., 2011) no se encontró asociación entre el GA y la ocurrencia de recidivas.

Según los resultados estadísticos obtenidos, animales de mayor edad (al momento del diagnóstico) presentan intervalos mayores entre recidivas y animales cuyo período entre recidivas es más extenso tienen mayor

expectativa de sobrevida. Sin embargo, a mayor tiempo de sobrevida mayor es el número de recidivas informadas. Los autores no hallaron en la bibliografía consultada ninguna información que vincule estas variables.

Respecto a la relación entre el tipo de tratamiento y la sobrevida y la ocurrencia de recidivas, contamos con escasa información. El único caso en el cual se informa cirugía radical y se conoce su evolución, no presentó recidivas luego de aquel procedimiento y fue uno de los dos pacientes con sobrevida más extensa, lo que coincide con lo hallado por otros autores (Hendrick, 1999). Sin embargo, es imposible extraer conclusiones definitivas al respecto, ya que se trata de un único caso.

El porcentaje de células proliferantes se asoció significativamente con GA (relación directa), edad al momento del diagnóstico (relación inversa) y número de recidivas (relación inversa). Esto pareciera indicar que para estas neoplasias a menor edad, mayor es el porcentaje de células proliferantes y a mayor proliferación, menor la capacidad de recidivar. Sin embargo, si bien existen antecedentes de neoplasias que se comportan más agresivamente en jóvenes (Poles y col., 2016), es indispensable disponer de mayor información sobre otras variables relacionadas. Lamentablemente, el tamaño al momento del diagnóstico y la agresividad del tratamiento quirúrgico realizado, no fueron comunicadas y serían importantes para evaluar en forma más profunda la significación biológica de estos resultados estadísticos.

Cabe destacar que, en relación con la información obtenida sobre la ocurrencia de recidivas, no disponemos de información respecto de su confirmación histopatológica, con excepción de los cuatro casos de recidivas incluidos en la muestra. De los datos obtenidos mediante la encuesta realizada a los médicos veterinarios sólo contamos con la información aportada por estos, fundada en la ubicación anatómica y las características macroscópicas de la lesión, evaluadas a la luz del criterio profesional de cada uno de los informantes, que puede o no haberse confirmado mediante histopatología.

Anexo I

Encuesta a Médicos Veterinarios remitentes de casos seleccionados de sarcomas felinos en sitios de inoculación vacunal

Nombre del paciente: XXXXX

Propietario: XXXXX

N° de protocolo de histopatología: XXXXX (recibido.../.../...)

1- Edad al momento del diagnóstico clínico (consulta en que se detectó el tumor):.....

2- ¿Recibió tratamiento para esa neoplasia? MÉDICO / QUIRÚRGICO / NINGUNO (*borrar lo que NO corresponda*). En caso de haber recibido tratamiento descríbalos someramente.....

3- ¿Recidivó? Sí NO (*borrar lo que NO corresponda*). ¿Cuántas veces?.....

4-¿Cuánto tiempo luego del tratamiento recidivó? (en caso de haber recidivado más de una vez especificar para cada una, de no poseer registros exactos también resulta de utilidad conocer tiempos aproximados, en este último caso expresar: aproximadamente.....).....

5- ¿Halló Ud. evidencia de metástasis? Sí NO (*borrar lo que NO corresponda*) En caso afirmativo: ¿Cuáles fueron esas evidencias?.....

¿Se confirmó la sospecha de metástasis mediante algún método complementario?

¿Cuál?.....

6- ¿Aún sobrevive el paciente? Sí NO (*borrar lo que NO corresponda*) En caso negativo: ¿Cuál fue el tiempo de supervivencia luego del diagnóstico clínico? (de no poseer registros exactos también resulta de utilidad conocer tiempos aproximados, en este último caso expresar: aproximadamente.....).....¿Cuál fue la causa de muerte?.....

7-¿Existe la posibilidad de que haya sido vacunado en algún momento de su vida en el sitio de aparición del tumor? (*borrar lo que NO corresponda*)

Existe la posibilidad.

Tengo la certeza de que fue vacunado en ese sitio.

No existe ninguna posibilidad de que haya sido vacunado en ese sitio, por mí o por otro profesional.

8-¿Existe la posibilidad de que haya sido vacunado contra **RABIA** en algún momento de su vida en el sitio de aparición del tumor? (*borrar lo que NO corresponda*)

Existe la posibilidad.

Tengo la certeza de que fue vacunado en ese sitio.

No existe ninguna posibilidad de que haya sido vacunado en ese sitio, por mí o por otro profesional.

Anexo II

Tabla a. Matriz de correlación Bayesiana (GA, GI) (Risso y Risso, 2017)

| Variables | | R | p-value ⁽¹⁾ |
|-----------|----|-------|------------------------|
| GA | GI | -0,11 | 0,203 |

(1) $P > 0.05$ = no hay correlación significativa.

r=coeficiente de regresión

GA= grado de anaplasia.

GI= grado de inflamación.

p-value = valor de P.

Tabla b. Matriz de correlación Bayesiana (GA, variables demográficas y clínicas) (<https://jasp-stats.org/>)

| Variables | | Pearson cc | p-value ⁽¹⁾ |
|-----------|---------------------|---------------------|------------------------|
| GA | Sexo | -0,098 | 0,303 |
| GA | Raza | NaN ^{a(2)} | ----- |
| GA | Edad ⁽³⁾ | 0,03 | 0,76 |
| GA | UA | -0,076 | 0,413 |
| GA | EMD | 0,111 | 0,623 |
| GA | TPR | -0,124 | 0,661 |
| GA | NR | -0,296 | 0,1930 |
| GA | Tsd | -0,351 | 0,1830 |
| GA | Rsn | -0,04 | 0,8630 |

(1) $P > 0.05$ = no hay correlación significativa.

(2) NaN^a = Varianza = 0, no se realiza el análisis.

(3) Edad informada al momento de la remisión de la muestra en años.

Pearson cc = coeficiente de correlación.

p-value = valor de P.

GA= grado de anaplasia.

UA = ubicación anatómica.

EMD = edad al momento del diagnóstico clínico en años.

TPR = tiempo promedio entre recidivas en días.

NR = número de recidivas.

Tsd = tiempo de sobrevida en días.

Rsn = recidiva, si – no.

Tabla c. Matriz de correlación Bayesiana (GI, variables demográficas y clínicas) (<https://jasp-stats.org/>)

| Variables | | Pearson cc | p-value ⁽¹⁾ |
|-----------|---------------------|---------------------|------------------------|
| GI | Sexo | -0,129 | 0,1720 |
| GI | Edad ⁽²⁾ | 0,033 | 0,7370 |
| GI | Raza | NaN ^{a(3)} | ----- |
| GI | UA | -0,106 | 0,2560 |
| GI | EMD | -0,324 | 0,7310 |
| GI | TPR | -0,151 | 0,5920 |
| GI | NR | -0,03 | 0,8960 |
| GI | Tsd | -0,3 | 0,2590 |
| GI | Rsn | 0,198 | 0,3900 |

(1) $P > 0.05$ = no hay correlación significativa.

(2) Edad informada al momento de la remisión de la muestra en años.

(3) NaN^a = Varianza = 0, no se realiza el análisis.

Pearson cc = coeficiente de correlación.

p-value = valor de P.

GI= grado de inflamación.

UA = ubicación anatómica.

EMD = edad al momento del diagnóstico clínico en años.

TPR = tiempo promedio entre recidivas en días.

NR = número de recidivas.

Tsd = tiempo de sobrevida en días.

Rsn = recidiva, si – no.

Tabla d. Matriz de correlación Bayesiana (PCNA, variables demográficas y clínicas) (<https://jasp-stats.org/>)

| Variables | | Pearson cc | p-value ⁽¹⁾ |
|-----------|---------------------|---------------------|------------------------|
| PCP | Sexo | 0,04 | 0,387 |
| PCP | Raza | NaN ^{a(2)} | ----- |
| PCP | Edad ⁽³⁾ | -0,341 | 0,01 |
| PCP | UA | 0,039 | 0,39 |
| PCP | EMD | -0,442 | 0,02 |
| PCP | TPR | -0,124 | 0,661 |
| PCP | NR | -0,193 | 0,026 |
| PCP | Tsd | -0,072 | 0,395 |
| PCP | Rsn | -0,072 | 0,481 |
| PCP | GA | 0,244 | 0,037 |
| PCP | GI | -0,01 | 0,528 |

(1) $P > 0.05$ = no hay correlación significativa.

(2) NaN^a = Varianza = 0, no se realiza el análisis.

(3) Edad informada al momento de la remisión de la muestra en años.

Pearson cc = coeficiente de correlación.

p-value = valor de P.

GI= grado de inflamación.

GA= grado de anaplasia.

UA = ubicación anatómica.

EMD = edad al momento del diagnóstico clínico en años.

TPR = tiempo promedio entre recidivas en días.

NR = número de recidivas.

Tsd = tiempo de sobrevida en días.

Rsn = recidiva, si – no.

PCP porcentaje de células proliferantes.

Tabla e. Matriz de correlación Bayesiana (variables clínicas) (<https://jasp-stats.org/>)

| Variables | | Pearson cc | p-value ⁽¹⁾ |
|-----------|-----|---------------------|------------------------|
| EMD | TPR | 0,451 | 0,046 |
| EMD | Rsn | -0,065 | 0,607 |
| EMD | NR | 0,122 | 0,305 |
| EMD | Tsd | 0,23 | 0,205 |
| TPR | Rsn | NaN ^{a(2)} | ----- |
| TPR | NR | 0,049 | 0,431 |
| TPR | Tsd | 0,696 | 0,006 |
| Rsn | NR | 0,564 | 0,004 |
| Rsn | Tsd | 0,342 | 0,116 |
| NR | Tsd | 0,635 | 0,007 |

(1) $P > 0.05$ = no hay correlación significativa.

(2) NaN^a = Varianza = 0, no se realiza el análisis.

Pearson cc = coeficiente de correlación.

p-value = valor de P.

EMD = edad al momento del diagnóstico clínico en años.

TPR = tiempo promedio entre recidivas en días.

NR = número de recidivas.

Tsd = tiempo de sobrevida en días.

Rsn = recidiva, si – no.

Expresión de COX-2 en sarcomas asociados a sitios de inoculación

Introducción

La hipótesis más aceptada respecto al origen de los SSI centra su atención en el rol del proceso inflamatorio y postula que estaría dado por la transformación maligna de los fibroblastos reactivos en la periferia de la paniculitis granulomatosa necrotizante generada como respuesta a la inoculación de vacunas (Wilcock y col., 2012).

Este capítulo aborda los estudios inmunohistoquímicos necesarios para establecer la expresión de COX-2, enzima fundamental para el desarrollo de procesos inflamatorios, en los SSI. Además, de la evaluación de la asociación estadística de esta con parámetros surgidos de los estudios histopatológicos, del seguimiento clínico, y el porcentaje de células en proliferación.

Los conceptos teóricos relevantes para este capítulo fueron desarrollados previamente (ver capítulo I).

Materiales y métodos

Se seleccionaron 117 muestras, diagnosticadas como SSI entre 2011 y 2012. Cuatro de los casos corresponden a recidivas de otros sarcomas incluidos en la muestra.

Estudios histopatológicos

Se estableció el grado de inflamación (GI) y el grado de anaplasia (GA) para cada caso (ver capítulo II).

Estudios inmunohistoquímicos

Se realizaron sobre los 117 casos de SSI y sobre 14 casos de sarcomas no asociados a sitios de inoculación (NSSI), con ubicación retroocular (2), base de la oreja, globo ocular (2), oreja, encía, ilion, almohadilla plantar (2), anca, carpo izquierdo, distal de la tibia y dedo.

Se montaron secciones de 3 µm en portaobjetos con carga positiva (HistoSystem, Rosario, Argentina). Estos se desparafinaron, rehidrataron e incubaron en metanol con H₂O₂ al 3%, para inhibir la peroxidasa endógena, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron luego con solución *buffer*-fosfato (PBS), pH 7,4. La recuperación antigénica se realizó en dos ciclos de calentamiento con microondas a 800 W, durante 3 minutos cada uno, en *buffer*-citrato, pH 6,0. Los sitios de unión no específicos se bloquearon mediante incubación con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. El anticuerpo primario (anti-COX-2, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan) se incubó durante una noche a 4 ° C, en cámara húmeda. Se utilizó para la detección de COX-2 en SSI a una dilución de 1: 200 en BSA al 0,1%. Este anticuerpo se usó previamente con éxito en gatos (Bardagí y col., 2012, Newman y Mrkonjich, 2006). Como anticuerpo secundario se utilizó un sistema de anticuerpo anti-conejo unido a polímero (EnVision HRP ®, DakoCytomation, Carpinteria, California). Como control negativo

de anticuerpo, el anticuerpo se reemplazó por PBS, pH 7,4. Como control negativo de tejido, se procesó piel normal de gato, obtenida de animales remitidos para necropsia, además de los controles negativos internos que representan los tejidos no neoplásicos de cada muestra. Como control positivo, se usó *macula densa* de riñón de perro (Khan y col., 2001). Como cromógeno se utilizó 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), y como tinción de contraste hematoxilina.

Para determinar la susceptibilidad del antígeno COX-2 a la fijación prolongada con formol, se aplicó la técnica de inmunohistoquímica descrita anteriormente, a cortes de riñón de perro normal provenientes de muestras fijadas en formol al 10% durante 24 hs, una semana o un mes, con o sin recuperación antigénica.

La inmunomarcación de COX-2 se evaluó estimando el porcentaje de células positivas al contar células con marca citoplasmática positiva en imágenes de 10 campos a 40X. Las imágenes fueron capturadas usando una cámara de video analógica (Sony DXC-390) montada en un microscopio trinocular (CX31, Olympus, Japón) y conectada a una computadora. Las imágenes capturadas se procesaron utilizando un analizador de imágenes digitales (ImagePro Plus v6.3 - Media Cybernetics, Rockville).

Luego del conteo de células positivas, los casos se agruparon utilizando un esquema usado en tumores de mama (Lavalle y col., 2009) estableciendo un *score* (*variable score*) que asigna grado 0 a los negativos, 1 a los que

poseen entre 0% y 10% de células positivas, 2 entre 10% y 30%, 3 entre 30% y 60%, y 4 cuando el porcentaje de células positivas es mayor de 60. Además, se diseñó un esquema que considera grado 0 a los negativos y divide a los positivos en cuartiles (variable cuartiles).

La metodología para la inmunomarcación con anticuerpo anti-PCNA y su cuantificación se desarrolló en el capítulo II.

Análisis estadístico

La variable COX-2 fue considerada como porcentaje, *score* y cuartiles. En todos los casos fue comparada en relación con el GI y el GA. La metodología utilizada fue el análisis de varianza desde una perspectiva bayesiana. Para cumplir con los supuestos teóricos del ANOVA (análisis de varianza), se realizaron transformaciones obligatorias de los datos. En el caso de las variables porcentuales, la transformación elegida fue arcoseno. Para las variables *score* y cuartiles, se transformaron a raíz cuadrada. Se utilizaron distribuciones *prior* no informativas y se corrieron 20.000 iteraciones, descartando las primeras 1.000. Se usó el lenguaje de programación R y el *software* libre WinBUGS (Campbell y Thompson, 2012; Risso y Risso, 2017; Bolstad, 2007). Como análisis *pos hoc* se usó la prueba de Z Bayesiana. El nivel de significancia considerado fue $P \leq 0,05$. Se realizó, además, una prueba de correlación bayesiana para evaluar la asociación entre GA, COX-2 y porcentaje de células proliferantes, y entre GI, COX-2 y porcentaje de células proliferantes. También, se evaluó la asociación entre COX-2 y los parámetros demográficos y clínicos. Esta

metodología se aplicó mediante el uso de *software* JASP (<https://jasp-stats.org/>). Se consideraron significativos aquellos resultados con $P \leq 0.05$.

Resultados

Como se mencionó en el capítulo II, el GA II fue el más numeroso (ver capítulo II, tabla 4). Con respecto al grado de inflamación, la mayoría de los sarcomas fueron de grado 3 (ver capítulo II, tabla 5). No hubo asociación estadísticamente significativa entre las variables GA y GI ($P = 0.203$) (capítulo II, anexo II, tabla a).

La intensidad de inmunomarcación en la *macula densa* de muestras de riñón de perro (Fig. 20) tratadas con diferentes tiempos de fijación fue similar en todos los casos, tanto con recuperación como sin recuperación antigénica.

La inmunomarcación con COX-2 en SSI fue positiva en el 56,41% de los casos (Fig. 21) y negativa en el 43,6%. En los NSSI fue positiva en el 50% de los casos, negativa en el 42,85% y uno de los casos (7,14%) resultó dudoso. No se observaron variaciones en la expresión de COX-2 dentro de los tumores, ni en relación con las áreas con focos de infiltrado inflamatorio ni entre la periferia y el centro del tumor (considerando siempre áreas libres de necrosis).

Al evaluar el porcentaje de inmunomarcación de COX-2 y el grado de inflamación, hubo diferencias significativas en la expresión de COX-2 entre los grupos GI 1, GI 2 y GI 3 ($P < 0,05$, ANOVA, $n = 116$). La expresión de COX-2 fue más alta en muestras de GI 3, seguidas por las de GI 2 y luego las de GI 1 (Anexo III, tabla f). En contraste, al considerar el porcentaje de

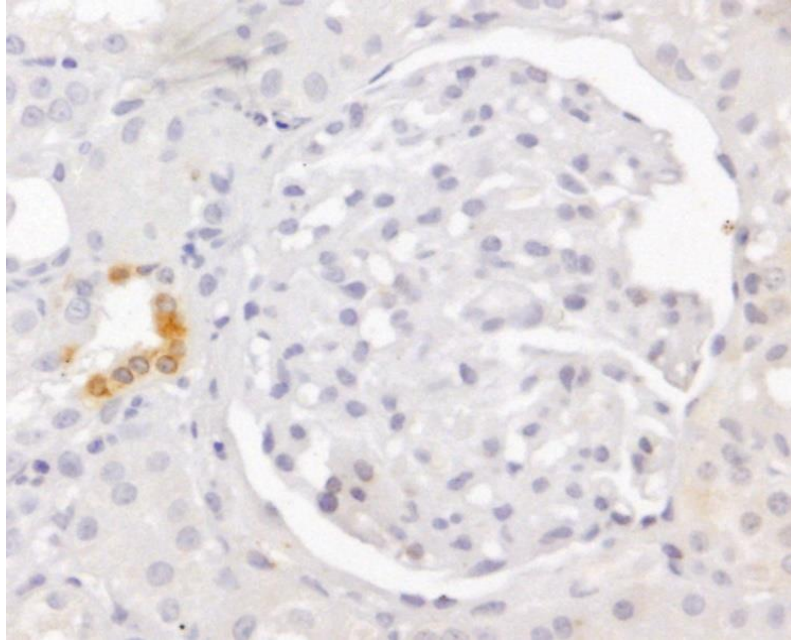


Figura 20. Se observa inmunomarcación positiva para COX-2 en la *macula densa* de riñón canino. DAB y hematoxilina 20X.

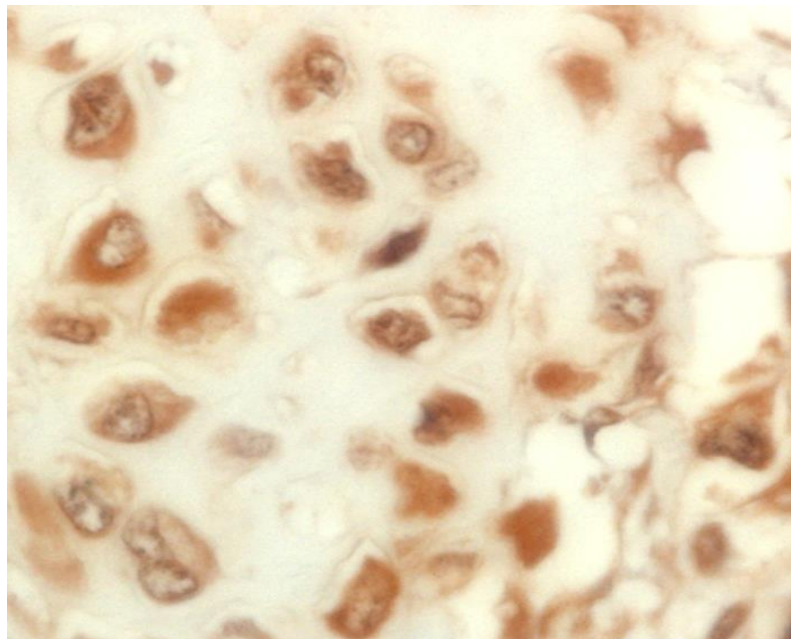


Figura 21. Se observa inmunomarcación positiva para COX-2 en sarcoma felino asociado con sitio de inoculación. DAB y hematoxilina 40X.

inmunomarcación de COX-2 y el grado de anaplasia, los grupos GA I y GA II no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, hubo diferencias significativas ($P < 0.05$, ANOVA, $n = 117$) entre los grupos GA I y GA II con el grupo GA III; los sarcomas con GA III presentaron la expresión más baja de COX-2 (Anexo III, tabla g). Se demostró, además, correlación significativa entre COX-2 y GI con relación directa, por lo tanto ambas variables se incrementan en forma simultánea ($P=0,018$) (Anexo III, tabla I). De modo opuesto, la prueba de correlación arrojó resultados no significativos para la relación entre COX-2 y GA ($P=0,4370$) (Anexo III, tabla I).

Con respecto a los agrupamientos ensayados (variable *score* y cuartiles), los grupos GI 1, GI 2 y GI 3 difieren significativamente en relación con la expresión de COX-2 para la variable *score*. Sin embargo, para este modelo el DIC (Deviance Information Criterion) resultó de 167 (Anexo III, tabla h). Según esta misma clasificación (variable *score*) no se hallaron diferencias significativas entre los grupos GA I, GA II y GA III en relación al GA, con un $DIC=171,5$ ($p > 0,05$) (Anexo III, tabla i).

Del mismo modo, los grupos GI 1, GI 2 y GI 3 difieren significativamente en relación con la expresión de COX-2 para la variable cuartiles. Sin embargo, su DIC fue de 137,5 (Anexo III, tabla j). Según esta clasificación (variable cuartiles) no se hallaron diferencias significativas entre los grupos GA I, II y III en relación al GA. El DIC fue de 142 (Anexo III, tabla k).

El porcentaje de células proliferantes y COX-2 correlacionan significativamente entre sí, en forma directa ($P = 0,017$) (Anexo III, tabla I).

En cambio, lo hicieron en forma inversa el tiempo promedio entre recidivas y COX2 ($P = 0,008$), y la edad al momento del diagnóstico clínico y COX-2 ($P = 0,003$) (Anexo III, tabla n).

No se halló correlación entre COX-2 y las variables sexo, raza, edad (al momento de remisión de la muestra) (Anexo III, tabla m), ocurrencia de recidivas, número de recidivas, tiempo de sobrevida (Anexo III, tabla n).

Discusión

La hipótesis más aceptada sobre el origen de los SSI felinos propone que este tipo de neoplasias se origina de la transformación maligna de fibroblastos, inducida por la inflamación crónica, generada por los adyuvantes presentes en las vacunas a virus muerto, en el sitio de inoculación (Hendrick y Dunagan, 1991; Hendrick y col., 1992; Kass y col., 1993; Goldschmidt y Hendrick, 2002; Deim y col., 2008; Wilcock y col., 2012).

En concordancia con lo descrito por Magi y col. (2010) y Carneiro y col. (2018), se observó que los SSI expresan COX-2. Esto difiere de lo informado por otros autores (Beam y col., 2003). Sin embargo, debe mencionarse que Beam y col. (2003), quienes no pudieron detectar la expresión de COX-2, utilizaron diferentes protocolos inmunohistoquímicos de los empleados en este estudio. Esto podría justificar las diferencias en los resultados. La técnica inmunohistoquímica (con biotina-estreptavidina) utilizada por estos autores fue diferente de la realizada en este trabajo; además, el anticuerpo primario anti-COX-2 utilizado (PG27B, Oxford

Biomedical Research, Oxford, Michigan) y su concentración, (1:100 en PBS) también fueron diferentes. Aunque la recuperación antigénica también se realizó en microondas, los dos ciclos de alta potencia realizados por estos autores fueron de diez minutos en lugar de los tres minutos utilizados en este trabajo. Por otro lado, Beam y col. (2003) informaron que el tiempo de fijación fue una de las posibles causas de la ausencia de marcación para COX-2 en su ensayo. Sin embargo, en el presente trabajo demostramos que COX-2 es un antígeno poco susceptible a variaciones en los tiempos de fijación, al menos de hasta un mes, por lo que resulta poco probable que esta fuera la causa de ausencia de detección del antígeno. Ya fue demostrado que diferentes antígenos tienen diferente susceptibilidad a la fijación (Nieto y col., 2003; Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara y Miller, 2014).

Es bien conocido que COX-2 es una molécula proinflamatoria (Williams y col., 1999; Cha y DuBois, 2007). En el presente trabajo demostramos que existe una estrecha relación entre COX-2 y la inflamación en los SSI, ya que existen diferencias significativas entre su expresión y los diferentes grados de inflamación de los sarcomas estudiados. De los resultados obtenidos, se puede concluir que la expresión de COX-2 es directamente proporcional al grado de inflamación, siendo mayor en las muestras que mostraron el mayor grado de inflamación.

Según los hallazgos de diferentes autores, la sobreexpresión de COX-2 está asociada con la proliferación e invasión tumoral, la inhibición de la apoptosis, la supresión de la vigilancia inmune y la angiogénesis (Williams

y col., 1999; Costa y col., 2002; Rodríguez y col., 2008). Esta enzima participa en la síntesis de múltiples derivados del ácido araquidónico, entre ellos PGE2 que está íntimamente relacionada con procesos carcinogénicos (Williams y col., 1999; O'Byrne y Dalglish, 2001; Nieto y col., 2003; Cha y DuBois, 2007; Rodríguez y col., 2008). Los hallazgos del presente trabajo muestran que la expresión de COX-2 se correlaciona positivamente con la proliferación de las células tumorales.

La inflamación crónica presente en el sarcoma de Kaposi también se asoció con la carcinogénesis, en este caso COX-2 participa en la progresión del tumor y su patogenia (Sharma-Walia y col., 2010). Asimismo, se demostró que esta enzima tiene valor pronóstico en numerosos procesos neoplásicos, incluidos el cáncer colorrectal humano y los tumores mamarios humanos y caninos (Couto y col., 2002; Lavallo y col., 2009; Wang y DuBois, 2010). En el caso del presente trabajo, los tumores altamente indiferenciados (GA III) presentaron menor expresión de COX-2. Esto podría deberse a la pérdida de la capacidad de síntesis de sustancias que se produce en las células altamente anaplásicas (Cullen y col., 2002). No se pudo establecer correlación estadísticamente significativa entre GA y COX-2, lo cual resulta coherente dado que dos de los grupos (GA I y GA II) no presentan diferencias significativas (ANOVA) respecto a su expresión de COX-2.

Ninguna de las distribuciones propuestas refleja el comportamiento de la población en relación a la expresión de COX-2 según el GA. Además, ambas presentan un elevado DIC (el DIC -Deviance Information Criteria- es

inversamente proporcional a la verosimilitud de los datos). El DIC permite evaluar el modelo, por lo tanto, podemos inferir que ninguna de las distribuciones representa un modelo adecuado.

En relación a las variables raza, sexo, edad, ocurrencia de recidivas, número de recidivas y tiempo de sobrevida no se halló correlación con COX-2. En cambio, se demostró que COX-2 se correlaciona significativamente con la edad al momento del diagnóstico clínico y con el tiempo promedio entre recidivas, variables con las que presenta una relación inversa. Esto significa que cuanto mayor es la expresión de COX-2 menor es el tiempo entre recidivas, y que la expresión de COX-2 resultó mayor en animales que fueron diagnosticados a edad más temprana. Magi y col. (2010) y Carneiro y col. (2018) no estudiaron ninguna de estas variables, por lo tanto no existen datos previos para comparar estos resultados.

Uno de los potenciales tratamientos para SSI es la terapia con inhibidores de COX-2. Esta terapia mostró resultados favorables en oncología humana y veterinaria (Cha y DuBois, 2007; Wang y DuBois, 2010; Barboza De Nardi y col., 2011). En medicina veterinaria, los inhibidores de COX-2 han mostrado efectos antineoplásicos en tumores caninos tales como carcinomas de células de transición y carcinomas orales de células escamosas. Además, se observaron resultados favorables después de su uso en el tratamiento de perros con pólipos rectales y carcinomas de mama inflamatorios (Barboza De Nardi y col., 2011). Magi y col. (2010) no hallaron asociación entre la expresión de COX-2 y el grado de anaplasia. Sin

embargo, en este trabajo se halló que los sarcomas de mayor grado mostraron una menor expresión de la enzima. Esto podría hacerlos menos susceptibles a la terapia con inhibidores de COX-2.

En el futuro, será necesario evaluar el valor pronóstico de la expresión de COX-2 y el valor terapéutico del uso de sus inhibidores en los SSI, a través de la evaluación de los protocolos terapéuticos que los incluyan, tanto para SSI como para NSSI, ya que estos también expresan COX-2. Si se verifica la utilidad de estos inhibidores, el grado de anaplasia tendría un valor predictivo con respecto a la susceptibilidad a este tipo de tratamiento para SSI con un alto grado de anaplasia. Si bien el tratamiento de elección en estos casos es la cirugía con amplio margen, los protocolos que incluyen inhibidores de COX-2 podrían contribuir a reducir el tamaño del tumor antes de la cirugía, a extender el período de supervivencia en tumores no resecables, y a extender el período entre las recidivas cuando la cirugía radical no es factible.

En el presente trabajo, se corroboró que existe asociación entre el grado de inflamación y la expresión de COX-2 en SSI. Esto sería particularmente valioso para predecir la expresión de COX-2 a partir del grado de inflamación, dado que su mayor expresión se da en las neoplasias con los mayores grados de inflamación. Esto proporcionaría una herramienta simple y económica para predecir la susceptibilidad a los tratamientos con inhibidores de la COX-2, para cada caso particular, ya que el grado de inflamación se establece con el procesamiento de rutina y con la tinción con hematoxilina y eosina, utilizada al momento del diagnóstico. Además, se

corroboró que en tumores altamente indiferenciados (DA III) disminuye la expresión de la enzima. Estos resultados podrían usarse como base para diseñar protocolos de tratamiento basados en el uso de inhibidores de COX-2 para los SSI.

Anexo III

Tabla f. ANOVA bayesiano con prueba posterior, desarrollado en R y WinBUGS (Risso y Risso, 2017). Variables COX-2 y GI

| Grupo (GI) | Mp | Dsp | N | LI025 | LS0975 | S | Tipo | DIC | Prueba COX-2 (%) |
|------------|--------|-------|----|--------|--------|---|------|------|------------------|
| 1 | 12,153 | 6,826 | 18 | 1,226 | 25,532 | a | GI | 70,5 | |
| 2 | 20,410 | 4,424 | 42 | 11,739 | 29,081 | b | GI | | |
| 3 | 26,918 | 3,892 | 56 | 19,290 | 34,545 | c | GI | | |

Grupo = grupos de estudio.

mp = media posterior.

dsp = desvío estándar posterior.

n = tamaño de la muestra.

ICB = Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

LI025 = ICB de 0.025, posterior.

LI0975 = ICB de 0.975, posterior.

S = Significación, medias dentro de la misma columna con diferente letra difieren significativamente $p \leq 0.05$ (prueba de Z bayesiana).

Método = Prueba de Probabilidad Bayesiana posterior, para valores obtenidos con WinBUGS. <https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-winbugs/>

DIC = Deviance Information Criteria, calificación del modelo bayesiano. <https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-dic/>

Tipo = tipo de variable estudiada.

Iteraciones = 20000 - 1000 de descarte.

Prior = Prior No Informativa para definir el modelo.

Ajuste del modelo = Prior Informativa (1 sola iteración).

Tabla g. ANOVA bayesiano con prueba posterior, desarrollado en R y WinBUGS (Risso y Risso, 2017). Variables COX-2 y GA

| Grupo (GA) | Mp | Dsp | N | LI025 | LS0975 | S | Tipo | DIC | Prueba COX-2 (%) |
|------------|--------|-------|----|--------|--------|---|------|------|------------------|
| 3 | 17,355 | 9,785 | 9 | 1,823 | 36,534 | a | GA | 74,0 | |
| 2 | 22,127 | 3,403 | 73 | 15,458 | 28,796 | b | GA | | |
| 1 | 23,190 | 4,995 | 35 | 13,400 | 32,979 | b | GA | | |

Grupo = grupos de estudio.

mp = media posterior.

dsp = desvío estándar posterior.

n = tamaño de la muestra.

ICB = Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

LI025 = ICB de 0.025, posterior.

LI0975 = ICB de 0.975, posterior.

S = Significación, medias dentro de la misma columna con diferente letra difieren significativamente $p \leq 0.05$ (prueba de Z bayesiana).

Método = Prueba de Probabilidad Bayesiana posterior, para valores obtenidos con WinBUGS. <https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-winbugs/>

DIC = Deviance Information Criteria, calificación del modelo bayesiano. <https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-dic/>

Tipo = tipo de variable estudiada.

Iteraciones = 20000 - 1000 de descarte.

Prior = Prior No Informativa para definir el modelo.

Ajuste del modelo = Prior Informativa (1 sola iteración).

Tabla h. ANOVA Bayesiano con prueba posterior, desarrollado en R y WinBUGS (Risso y Risso, 2017). Variables COX-2 (score) y GI

| Grupo (GI) | Mp | Dsp | N | LI025 | LS0975 | S | Tipo | DIC | Prueba |
|------------|-------|-------|----|-------|--------|---|------|-------|---------------|
| 1 | 0,942 | 0,368 | 18 | 0,221 | 1,664 | a | GI | 167,0 | COX-2 (score) |
| 2 | 1,425 | 0,239 | 42 | 0,957 | 1,892 | b | GI | | |
| 3 | 1,695 | 0,210 | 56 | 1,284 | 2,107 | c | GI | | |

Grupo = grupos de estudio.

mp = media posterior.

dsp = desvío estándar posterior.

n = tamaño de la muestra.

ICB = Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

LI025 = ICB de 0.025, posterior.

LI0975 = ICB de 0.975, posterior.

S = Significación, medias dentro de la misma columna con diferente letra difieren significativamente $p \leq 0.05$ (prueba de Z bayesiana).

Método = Prueba de Probabilidad Bayesiana posterior, para valores obtenidos con WinBUGS. <https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-winbugs/>

DIC = Deviance Information Criteria, calificación del modelo bayesiano. <https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-dic/>

Tipo = tipo de variable estudiada.

Iteraciones = 20000 - 1000 de descarte.

Prior = Prior No Informativa para definir el modelo.

Ajuste del modelo = Prior Informativa (1 sola iteración).

Tabla i. ANOVA Bayesiano con prueba posterior, desarrollado en R y WinBUGS (Risso y Risso, 2017). Variables COX-2 (score) y GA

| Grupo (GA) | Mp | Dsp | N | LI025 | LS0975 | S | Tipo | DIC | Prueba COX-2 (score) |
|------------|-------|-------|----|-------|--------|---|------|-------|----------------------|
| 3 | 1,442 | 0,528 | 9 | 0,408 | 2,476 | a | GA | 171,5 | |
| 1 | 1,453 | 0,265 | 35 | 0,933 | 1,972 | a | GA | | |
| 2 | 1,479 | 0,187 | 73 | 1,113 | 1,844 | a | GA | | |

Grupo = grupos de estudio.

mp = media posterior.

dsp = desvío estándar posterior.

n = tamaño de la muestra.

ICB = Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

LI025 = ICB de 0.025, posterior.

LI0975 = ICB de 0.975, posterior.

S = Significación, medias dentro de la misma columna con diferente letra difieren significativamente $p \leq 0.05$ (prueba de Z bayesiana).

Método = Prueba de Probabilidad Bayesiana posterior, para valores obtenidos con WinBUGS. <https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-winbugs/>

DIC = Deviance Information Criteria, calificación del modelo bayesiano. <https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-dic/>

Tipo = tipo de variable estudiada.

Iteraciones = 20000 - 1000 de descarte.

Prior = Prior No Informativa para definir el modelo.

Ajuste del modelo = Prior Informativa (1 sola iteración).

Tabla j. ANOVA Bayesiano con prueba posterior, desarrollado en R y WinBUGS (Risso y Risso, 2017). Variables COX-2 (cuartiles) y GI

| Grupo (GI) | Mp | Dsp | N | LI025 | LS0975 | S | Tipo | DIC | Prueba COX-2 (cuartiles) |
|------------|-------|-------|----|-------|--------|---|------|-------|--------------------------|
| 1 | 0,721 | 0,316 | 18 | 0,101 | 1,340 | a | GI | 137,5 | |
| 2 | 1,187 | 0,205 | 42 | 0,786 | 1,588 | b | GI | | |
| 3 | 1,410 | 0,180 | 56 | 1,057 | 1,763 | c | GI | | |

Grupo = grupos de estudio.

mp = media posterior.

dsp = desvío estándar posterior.

n = tamaño de la muestra.

ICB = Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

LI025 = ICB de 0.025, posterior.

LI0975 = ICB de 0.975, posterior.

S = Significación, medias dentro de la misma columna con diferente letra difieren significativamente $p \leq 0.05$ (prueba de Z bayesiana).

Método = Prueba de Probabilidad Bayesiana posterior, para valores obtenidos con WinBUGS. <https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-winbugs/>

DIC = Deviance Information Criteria, calificación del modelo bayesiano. <https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-dic/>

Tipo = tipo de variable estudiada.

Iteraciones = 20000 - 1000 de descarte.

Prior = Prior No Informativa para definir el modelo.

Ajuste del modelo = Prior Informativa (1 sola iteración).

Tabla k. ANOVA Bayesiano con prueba posterior, desarrollado en R y WinBUGS (Risso y Risso, 2017). Variables COX-2 (cuartiles) y GA

| Grupo (GA) | Mp | Dsp | N | LI025 | LS0975 | S | Tipo | DIC | Prueba |
|------------|-------|-------|----|-------|--------|---|------|-------|-------------------|
| 3 | 1,109 | 0,453 | 9 | 0,220 | 1,998 | a | GA | 142,0 | COX-2 (cuartiles) |
| 1 | 1,196 | 0,228 | 35 | 0,750 | 1,643 | a | GA | | |
| 2 | 1,232 | 0,160 | 73 | 0,918 | 1,546 | a | GA | | |

Grupo = grupos de estudio.

mp = media posterior.

dsp = desvío estándar posterior.

n = tamaño de la muestra.

ICB = Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

LI025 = ICB de 0.025, posterior.

LI0975 = ICB de 0.975, posterior.

S = Significación, medias dentro de la misma columna con diferente letra

difieren significativamente $p \leq 0.05$ (prueba de Z bayesiana).

Método = Prueba de Probabilidad Bayesiana posterior, para valores obtenidos con

WinBUGS. <https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-winbugs/>

DIC = Deviance Information Criteria, calificación del modelo bayesiano.

<https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-dic/>

Tipo = tipo de variable estudiada.

Iteraciones = 20000 - 1000 de descarte.

Prior = Prior No Informativa para definir el modelo.

Ajuste del modelo = Prior Informativa (1 sola iteración).

Tabla I. Matriz de correlación Bayesiana (COX-2, GA, GI, PCNA)
 (<https://jasp-stats.org/>)

| Variables | | Pearson cc | p-value ⁽¹⁾ |
|-----------|-----|------------|------------------------|
| COX-2 | GA | -0,015 | 0,4370 |
| COX-2 | GI | 0,285 | 0,018 |
| COX-2 | PCP | 0,29 | 0,0170 |

(1) $P > 0.05$ = no hay correlación significativa.

Pearson cc = coeficiente de correlación.

p-value = valor de P.

GI= grado de inflamación.

GA= grado de anaplasia

COX-2= Porcentaje de expresión de COX-2.

PCP= Porcentaje de células proliferantes.

Tabla m. Matriz de correlación Bayesiana (COX-2, variables demográficas)

(<https://jasp-stats.org/>)

| Variables | | Pearson cc | p-value(1) |
|-----------|------|----------------------|------------|
| COX-2 | Sexo | -0,02 | 0,4900 |
| COX-2 | Edad | -0,017 | 0,4310 |
| COX-2 | Raza | NaN ^a (2) | ----- |

(1) $P > 0.05$ = no hay correlación significativa.

(2) NaN^a = Varianza = 0, no se realiza el análisis.

Pearson cc = coeficiente de correlación.

p-value = valor de P.

Edad= edad en años informada al momento de remisión de la muestra.

COX-2= Porcentaje de expresión de COX-2.

Tabla n. Matriz de correlación Bayesiana (COX-2, variables clínicas)
 (<https://jasp-stats.org/>)

| Variables | | Pearson cc | p-value(1) |
|-----------|-----|------------|------------|
| COX-2 | EMD | -0,571 | 0,0030 |
| COX-2 | TPR | -0,607 | 0,0080 |
| COX-2 | Rsn | 0,082 | 0,6370 |
| COX-2 | NR | -0,172 | 0,2280 |
| COX-2 | Tsd | -0,264 | 0,1610 |

(1) $P > 0.05$ = no hay correlación significativa.

Pearson cc = coeficiente de correlación.

p-value = valor de P.

EMD = edad al momento del diagnóstico clínico en años.

TPR = tiempo promedio entre recidivas en días.

Rsn = recidiva, si – no.

NR = número de recidivas.

Tsd = tiempo de sobrevida en días.

COX-2= Porcentaje de expresión de COX-2.

Expresión de FGFR-2 y PDGFR α en sarcomas asociados a sitios de inoculación

Introducción

La inestabilidad genética y epigenética de las células malignas lleva a la sobreproducción de factores de crecimiento, entre los que se incluyen FGF y PDGF, que poseen un amplio espectro de funciones biológicas sobre la proliferación, migración y diferenciación celular. También, las células inflamatorias que infiltran las neoplasias malignas secretan citoquinas y proteasas como las metaloproteinasas, que colaboran con la angiogénesis y, por lo tanto, con el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis (Cao y col., 2008).

Los FGFs constituyen una familia de factores de crecimiento que afectan el crecimiento, la diferenciación, la migración y la supervivencia de una amplia variedad de tipos celulares. En particular, FGF-2 regula el crecimiento y la función de células vasculares y por esto ha sido implicado en la angiogénesis como parte de la patogenia de diversas enfermedades (Nugent e Iozzo, 2000), así como en la curación de heridas, reparación tisular y hematopoyesis (Dow y Vere White, 2000). FGF-2 es sintetizado principalmente por los fibroblastos y actúa por vías autocrina y paracrina (Dow y Vere White, 2000).

El receptor de FGF-2 (FGFR-2) se compone de un dominio extracelular representado por un dominio tipo inmunoglobulina (IG), un dominio transmembrana, y un dominio intracelular tirosinquinasa. La unión de FGF-

2 a su dominio extracelular (IG) activa el dominio transmembrana y la tirosinquinasa intracelular. La dimerización del dominio tirosinquinasa resulta en su fosforilación, que inicia una cascada de señales que culminan en la regulación de la transcripción génica (Dow y Vere White, 2000).

Las neoplasias no podrían crecer más allá de los 3mm sin angiogénesis. Específicamente, FGF-2 iniciaría la angiogénesis y estimularía el crecimiento neoplásico (Dow y Vere White, 2000).

La actividad de los miembros de la familia PDGF es mediada por receptores tirosinquinasa, representados por dos homodímeros y un heterodímero ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$) (ver capítulo I) (Cao y col., 2008). Estos factores de crecimiento, al igual que FGF-2, estimulan el crecimiento de células vasculares y neoplásicas (Dow y Vere White, 2000). La activación autocrina de la vía de señalización de PDGF está involucrada en leucemias, gliomas, y sarcomas humanos, mientras que la acción paracrina de PDGF fue observada en cánceres epiteliales humanos. En estos casos PDGF afecta el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la capacidad para invadir localmente y generar metástasis (Andrae y col., 2008).

Las células del endotelio vascular usualmente no responden a la estimulación con PDGF. Sin embargo, estas se vuelven sensibles luego de la estimulación con FGF. Esto se debe a que estas células normalmente expresan niveles indetectables de receptores de PDGF (PDGFR). Los niveles de PDGFR- α y PDGFR- β se incrementan y pasan a ser detectables solo en presencia de FGF-2. Esto sugiere que FGF-2 estimula la expresión

de ambos receptores. A su vez, PDGF amplifica la expresión de receptores de FGF en células vasculares murales (Cao y col., 2008).

FGF y PDGF están frecuentemente coexpresados en tumores y su expresión se asoció con la progresión y la capacidad metastásica. La acción es sinérgica porque la coexpresión promueve el crecimiento tumoral en mayor medida que la de cualquiera de los factores por separado (Cao y col., 2008).

Se han descrito mutaciones activadoras en el gen de PDGFR α en numerosas neoplasias humanas de variadas estirpes celulares. Si bien algunas evitan la respuesta del receptor ante la presencia de PDGF o no modifican su actividad, otras permiten su activación en ausencia de ligando. Pacientes con el último tipo de mutaciones respondieron favorablemente al tratamiento con inhibidores de tirosinquinasa (mesilato de imatinib) (Heinrich y col., 2003; Velghe y col., 2014). Los FGFR también presentan mutaciones activadoras que llevan a la activación de su función quinasa e incluso podrían influir en la respuesta a la terapia farmacológica con drogas como AZD4547, BGJ-398, TKI258, JNJ42756493 and AP24534 (Patani y col., 2016). Las mutaciones de FGFR-2 jugarían un papel en la carcinogénesis (Jang y col., 2001). Las mutaciones activadoras de FGFR-2 fueron vinculadas con pobre pronóstico en neoplasias humanas (Jeske y col., 2017).

Los inhibidores de tirosinquinasa actualmente están cambiando el enfoque terapéutico en tumores malignos en perros y gatos. Imatinib inhibe la

actividad de varias tirosinquinazas, entre ellas el PDGFR. La desregulación y las mutaciones de tirosinquinazas se hallaron en tumores caninos y felinos, entre ellos mastocitomas y tumores estromales gastrointestinales (Bonkobara, 2015). Además, se han encontrado mutaciones de PDGFR en hemangiosarcoma canino. Imatinib tuvo actividad antitumoral con toxicidad tolerable en neoplasias de mastocitos en perros y gatos (Bonkobara, 2015). Las vías de señalización de los factores de crecimiento son de vital interés en la comprensión de la patogenia de las neoplasias. En particular, la importancia de conocer la expresión de receptores de factores de crecimiento radica en que estos constituyen los posibles blancos terapéuticos, más allá que exista o no expresión de sus ligandos, dado que podrían activarse aun en su ausencia cuando poseen mutaciones que permiten su autoactivación.

El presente capítulo aborda la exploración de los factores de crecimiento mencionados y sus receptores, además de la evaluación de variables angiogénicas de interés.

Materiales y métodos

Se procesaron muestras de 54 casos con diagnóstico de SSI y 10 casos de muestras de NSSI. Estos últimos, ubicados en base de la oreja, almohadilla plantar, anca, carpo, distal de la tibia, dedo, globo ocular (2) y región retro ocular (2).

Estudios inmunohistoquímicos

Se montaron secciones de 3 μm en portaobjetos con carga positiva (HistoSystem, Rosario, Argentina) que se aclararon en xilol y se rehidrataron en una batería de alcoholes de concentración creciente. Se incubaron en metanol con H_2O_2 al 3%, para inhibir la peroxidasa endógena, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron luego con solución *buffer*-fosfato (PBS), pH 7,4. Para la detección de los receptores y CD31 no se realizó recuperación antigénica dado que en la puesta a punto se comprobó que no existían diferencias en la intensidad de marca si el procesamiento se realizaba con o sin recuperación antigénica. Para FGF-2 y PDGF-B se realizó recuperación antigénica en microondas (dos ciclos de calentamiento con microondas a 800 W, durante 3 minutos cada uno, en *buffer* citrato, pH 6,0). Los sitios de unión no específicos se bloquearon mediante incubación con albúmina de suero bovino al 1% (BSA) durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los anticuerpos primarios (Rabbit anti-Human PDGFR α Polyclonal Antibody [MBS301499], MyBioSource, San Diego; Anti-FGFR-2, Lifespan BioSciences Inc., Seattle; Rabbit anti-Human FGF-2 Polyclonal Antibody [ab126861] Abcam, Cambridge; Rabbit anti-Human PDGF-B Polyclonal Antibody [sc-127] Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz; Rabbit Anti-CD31 polyclonal antibody [ab28364], Abcam, Cambridge) se incubaron durante una noche a 4° C, en cámara húmeda. Se utilizó tanto para anti-PDGFR α como para anti-FGFR-2 y para anti-PDGF-B una dilución de 1:100 en BSA al 0,1%. Para el anticuerpo anti-CD31 se utilizó una dilución de 1:25 en BSA

al 0,1% y para el anti-FGF-2 una dilución de 1:50. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-conejo (EnVision HRP ®, DakoCytomation, Carpinteria, California) para FGFR-2 y PDGFR α . Para los restantes anticuerpos se utilizó el método de la estreptavidina biotina marcada (Super Sensitive™ Link-Label IHC Detection System RTU MultiLink®/HRP [QP900-9], BioGenex Laboratories, Inc, Fremont, California; para CD31 y CytoScan™ HRP Detection System, Rockling, California para FGF-2 y PDGF-B). En este sistema luego de la incubación del tejido con el anticuerpo primario se realizó una incubación con un anticuerpo secundario biotinilado y por último se aplicó la solución de estreptavidina marcada con peroxidasa. Como control negativo de anticuerpo, el anticuerpo primario se reemplazó por PBS, pH 7,4. Como control negativo de tejido, se usó piel normal de gato, obtenida de animales remitidos para necropsia en el caso de FGFR-2 y PDGFR α . Además, de los controles negativos internos que representan los tejidos no neoplásicos de cada muestra y no vasculares para el caso de CD31. Como control positivo, se usó riñón de perro (fig. 22) y de gato (fig. 23) para PDGFR α (Gesualdo y col., 1994), y para FGFR-2 se utilizó estómago de rata (fig. 24) y de gato (fig. 25) (Hughes, 1997) y vasos sanguíneos dérmicos de gato para CD31 (fig. 26). Como cromógeno se utilizó 3,3- tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), y se usó hematoxilina como tinción de contraste.

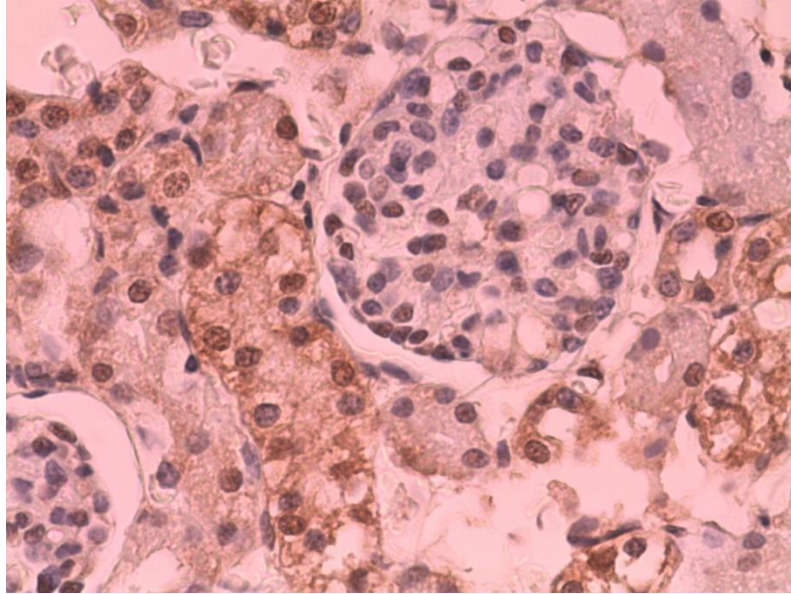


Figura 22. Riñón canino. Se observa inmunomarcación positiva en los túbulos para PDGFR α . DAB y hematoxilina, 40X.

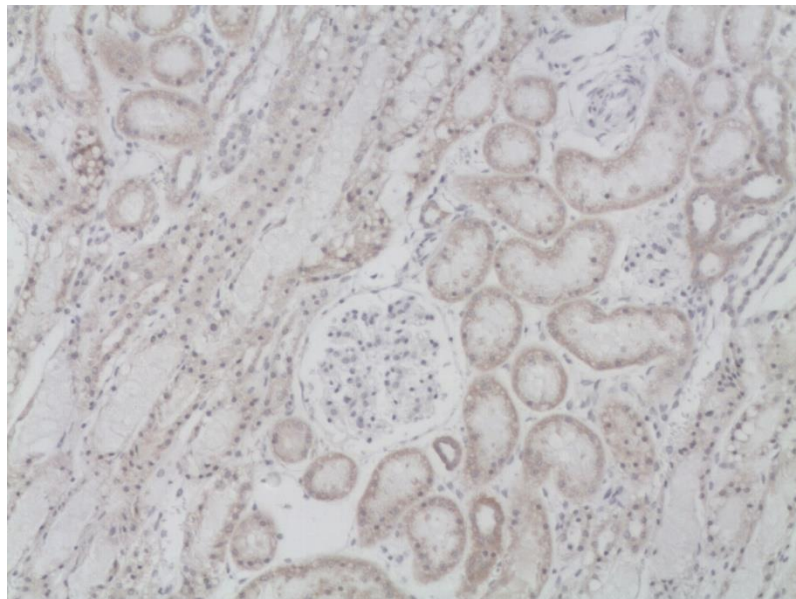


Figura 23. Riñón felino. Se observa inmunomarcación positiva en los túbulos para PDGFR α . DAB y hematoxilina, 10X.

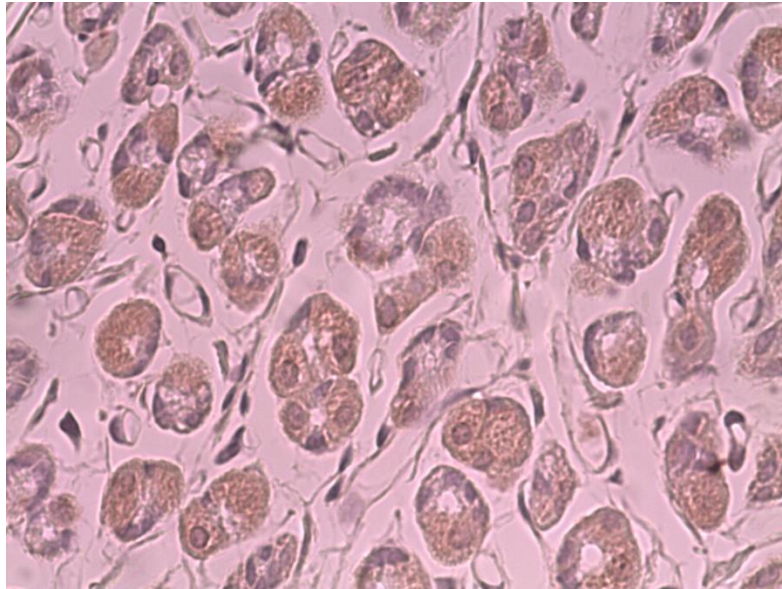


Figura 24. Estómago de rata. Se observa inmunomarcación positiva para FGFR-2 en las glándulas fúndicas. DAB y hematoxilina, 40X.

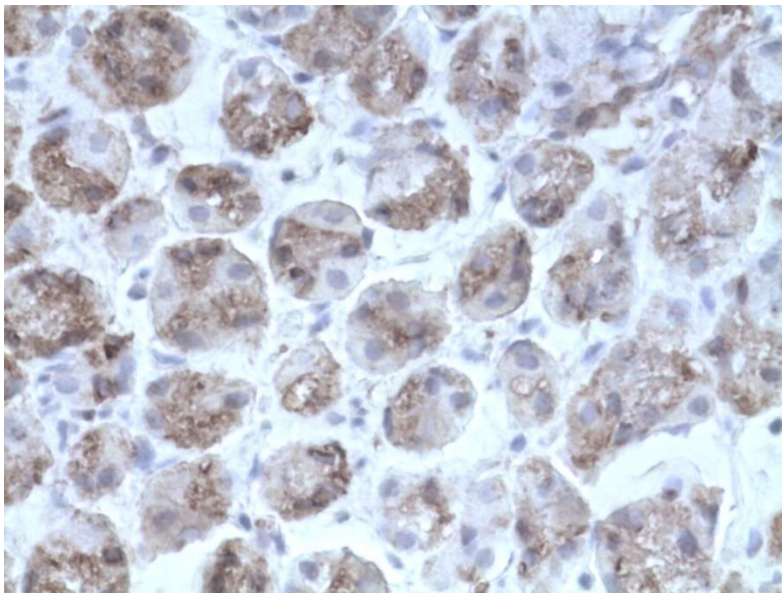


Figura 25. Estómago de gato. Se observa inmunomarcación positiva para FGFR-2 en las glándulas fúndicas. DAB y hematoxilina, 40X.

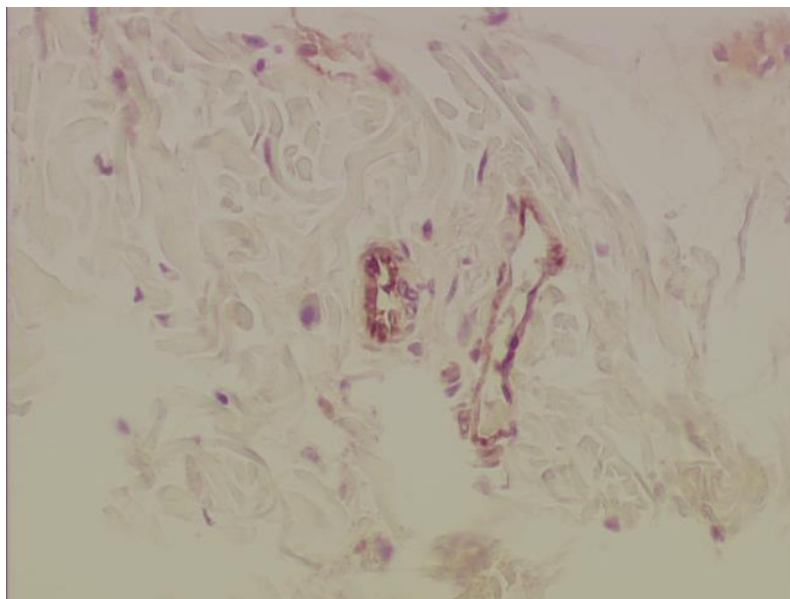


Figura 26. Piel de gato. Se observa inmunomarcación positiva para CD31 en los vasos dérmicos (control). DAB y hematoxilina, 20X.

La inmunomarcación de PDGFR α y FGFR-2 se evaluó estimando el porcentaje de células positivas al contar células con marca citoplasmática positiva en imágenes de 10 campos a 40X. Las imágenes fueron capturadas usando una cámara de video analógica (Sony DXC-390) montada en un microscopio trinocular (CX31, Olympus, Japón) y conectada a una computadora. Las imágenes capturadas se procesaron utilizando un analizador de imágenes digitales (ImagePro Plus v6.3 - Media Cybernetics, Rockville).

La valoración de la marca para FGF-2 (6 casos) y PDGF-B (10 casos) se realizó de modo cualitativo como positiva o negativa tanto para células neoplásicas como para vasos sanguíneos.

El número de vasos por campo, área vascular por campo y densidad vascular por campo fueron evaluados a partir de imágenes tomadas a 20X

de cortes marcados con anticuerpos anti-CD31 (fig. 27) (Álvarez Martín y col., 2009), mediante una selección de campos realizada con un recorrido en guarda griega desde la periferia hacia el centro, descartando las áreas de necrosis. Se evaluaron 10 imágenes de cada caso, a excepción de aquellos cuya extensión limitó el número de imágenes, en esos casos se tomaron todas las imágenes posibles para el área de la muestra en cuestión. Las imágenes fueron capturadas usando una cámara de video analógica (Sony DXC-390) montada en un microscopio trinocular (CX31, Olympus, Japón) y conectada a una computadora. Las imágenes capturadas se procesaron utilizando un analizador de imágenes digitales (ImagePro Plus v6.3 - Media Cybernetics, Rockville).

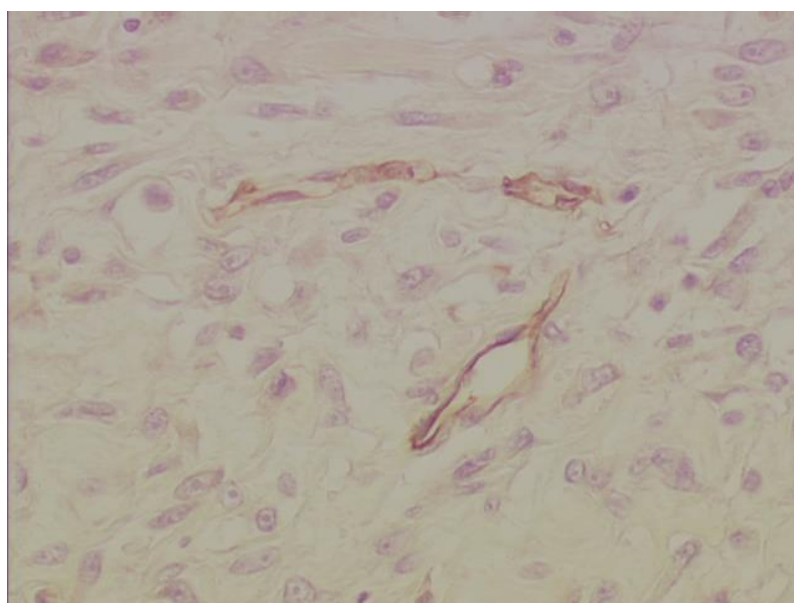


Figura 27. SSI. Se observa inmunomarcación positiva para CD31 en los vasos. DAB y hematoxilina, 20X.

Análisis estadístico

Para evaluar la relación entre las variables estudiadas se aplicó la metodología de correlación bayesiana mediante el uso de *software* JASP (<https://jasp-stats.org/>). Además, se evaluó la asociación mediante análisis de varianza desde una perspectiva bayesiana para las variables GA y GI con FGFR-2, PDGFR α . Para cumplir con los supuestos teóricos del ANOVA, se realizaron transformaciones obligatorias de los datos. En el caso de las variables porcentuales, la transformación elegida fue arcoseno. Se utilizaron distribuciones *prior* no informativas y se corrieron 20.000 iteraciones, descartando las primeras 1.000. Se usó lenguaje de programación R y software libre WinBUGS (Campbell y Thompson, 2012; Risso y Risso, 2017). Como análisis *pos hoc* se usó la prueba de Z bayesiana. El nivel de significancia considerado fue $P \leq 0,05$.

Resultados

El 100% de las neoplasias expresó PDGFR α (fig. 28) y el 50% expresó FGFR-2 (fig. 29). Nueve (90%) de los NSSI resultaron positivos para PDGFR α , uno resultó negativo y 7 (70%) fueron positivos para FGFR-2, 3 (30%) negativos. El 100% de las muestras evaluadas por FGF-2 (6 casos) y PDGF-B (10 casos) resultaron positivas; tanto las células neoplásicas (fig. 30 y 31) como los vasos sanguíneos expresaron estos antígenos. En ambos casos se observó marca positiva citoplasmática y en el caso de FGF-2 también se observó inmunomarcación nuclear (fig. 32), aunque con menor frecuencia. También, se halló inmunomarcación nuclear de su receptor (fig. 33).

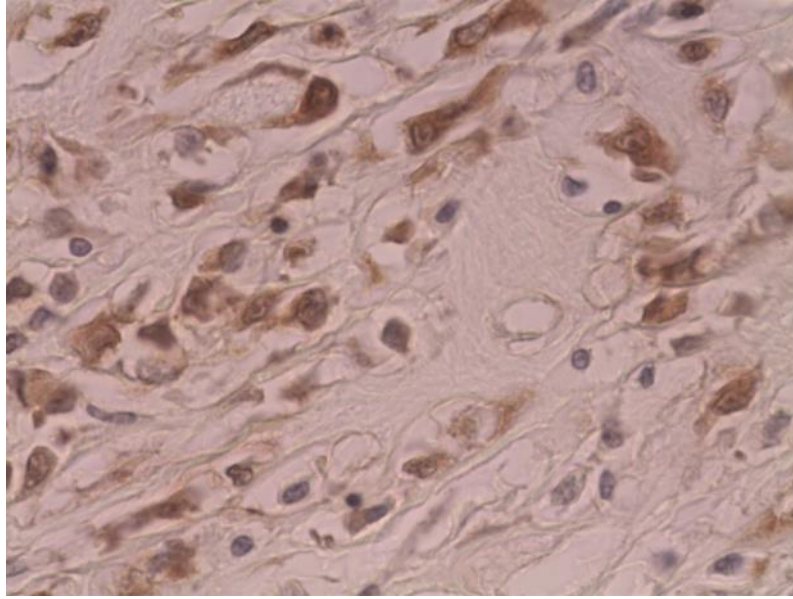


Figura 28. SSI. Se observa inmunomarcación positiva para PDGFR α . DAB y hematoxilina, 40X.

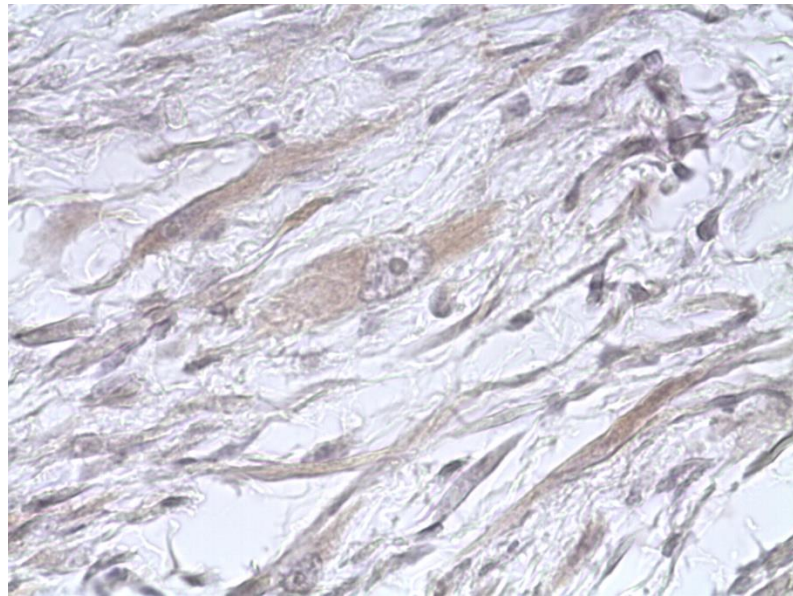


Figura 29. SSI. Se observa inmunomarcación positiva para FGFR-2. DAB y hematoxilina, 40X.

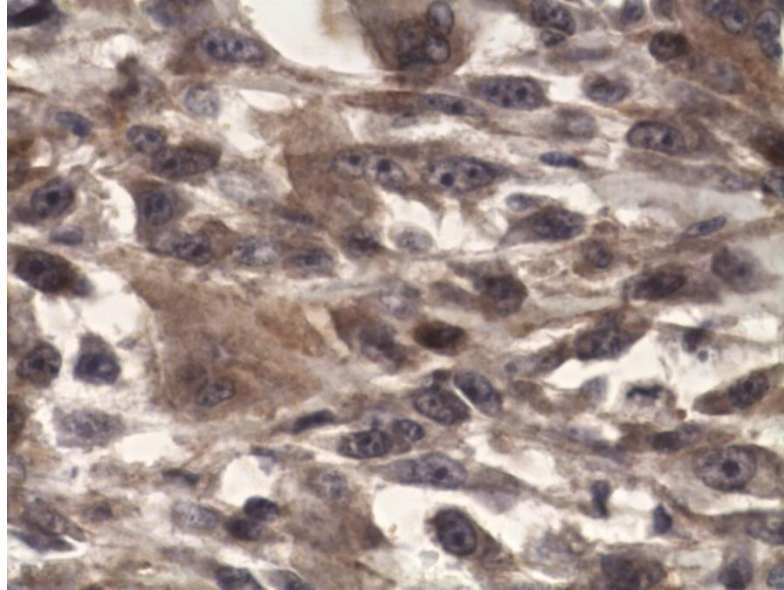


Figura 30. SSI. Se observa inmunomarcación citoplasmática positiva para FGF-2. DAB y hematoxilina, 40X.

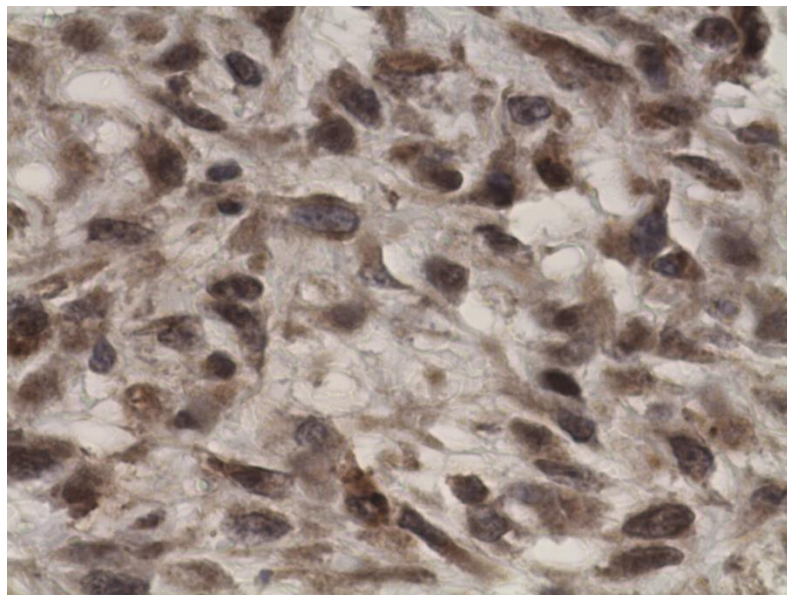


Figura 31. SSI. Se observa inmunomarcación positiva para PDGF-B. DAB y hematoxilina, 40X.

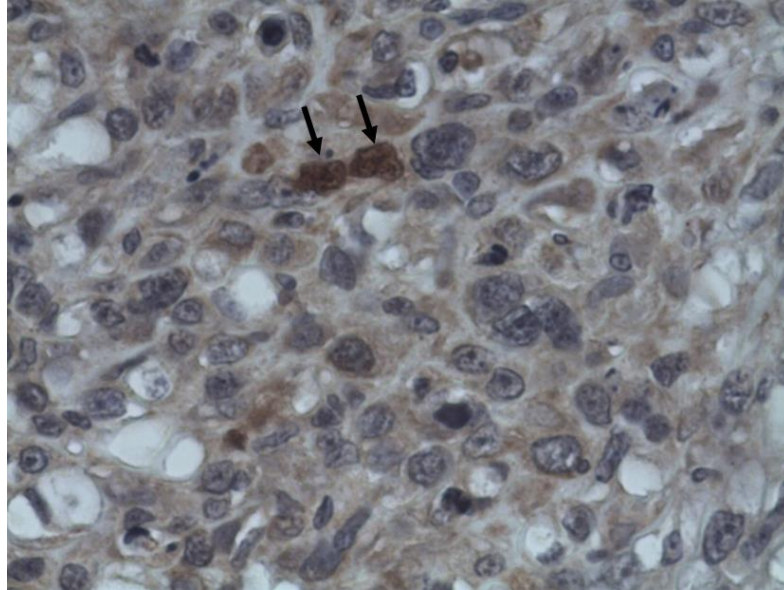


Figura 32. SSI. Se observa inmunomarcación nuclear positiva (flechas) para FGF-2. DAB y hematoxilina, 40X.

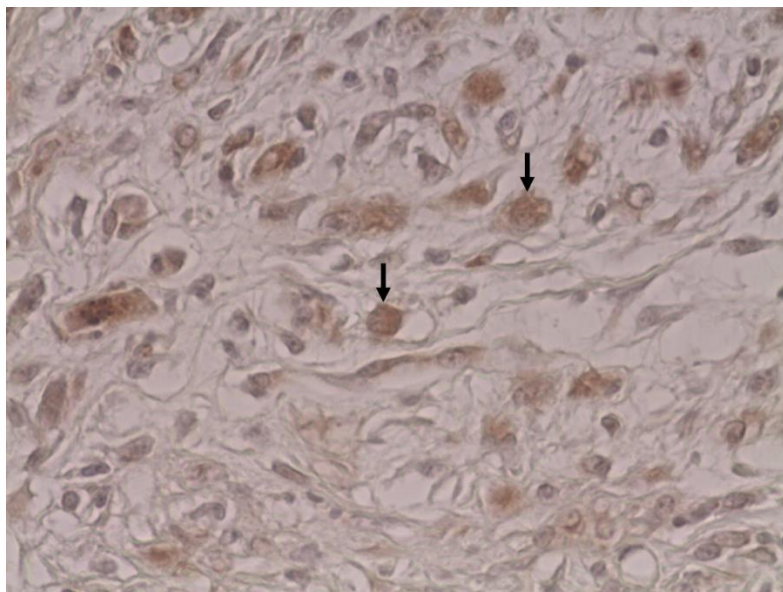


Figura 33. SSI. Se observa inmunomarcación nuclear positiva (flechas) para FGFR-2. DAB y hematoxilina, 40X.

El porcentaje de células proliferantes y PDGFR α correlacionaron significativamente entre sí (P = 0,012) con una relación directa (Anexo IV, tabla t). Del mismo modo, lo hicieron el porcentaje de células proliferantes y FGFR-2 (P = 0,035) (Anexo IV, tabla t).

Las variables GA y FGFR-2 se correlacionaron positivamente, a mayor GA mayor expresión de FGFR-2 (P=0,015) (Anexo IV, tabla r). La expresión de este receptor no se relacionó con las variables sexo, GI, COX-2, edad al momento del diagnóstico clínico, tiempo promedio entre recidivas, número de recidivas, tiempo de sobrevida, existencia de recidivas (Anexo IV, tabla r).

Las variables sexo, edad al momento del diagnóstico clínico, existencia de recidivas, número de recidivas, tiempo promedio entre recidivas, tiempo de sobrevida, GA, GI y COX-2 no se correlacionaron con PDGFR α (Anexo IV, tabla s).

No se halló correlación entre FGFR-2 y PDGFR α (P=0,062) (Anexo IV, tabla t). Ambos receptores se correlacionaron positivamente con el porcentaje de células proliferantes (FGFR-2, P=0,035; PDGFR α , P=0,012) (Anexo IV, tabla t). La prueba de análisis de varianza (ANOVA) reveló que los sarcomas con GA I mostraron menor expresión de FGFR-2 (Anexo IV, tabla ñ) y PDGFR α (Anexo IV, tabla o).

Al contrario, los diferentes grados de inflamación no mostraron diferencias en relación con la expresión de FGFR-2 (Anexo IV, tabla p) y PDGFR α (Anexo IV, tabla q) con esta misma prueba.

Al considerar las variables vasculares se halló que la cantidad de vasos por campo correlacionó positivamente con COX-2, al aumentar COX-2 aumentan los vasos por campo ($P=0,031$) (Anexo IV, tabla t). Sin embargo, lo hizo inversamente con PDGFR α (Anexo IV, tabla s), por lo tanto, a mayor cantidad de vasos por campo los sarcomas expresaron PDGFR α en menor medida ($P=0,039$). También, se halló correlación positiva entre el porcentaje de células proliferantes y área vascular por campo ($P=0,033$), y el porcentaje de células proliferantes y la densidad vascular por campo ($P=0,033$) (Anexo IV, tabla t). El área vascular por campo ($P=0,04$) y la densidad vascular por campo ($P=0,041$) se correlacionaron positivamente con el tiempo de supervivencia (Anexo IV, tabla u). A excepción de la cantidad de vasos por campo con PDGFR α , las variables vasculares no mostraron correlación con los receptores de ambos factores de crecimiento estudiados (Anexo IV, tabla t).

Discusión

Los SSI expresan PDGFR α y FGFR-2. Ambos, FGFR-2 y PDGFR α , se expresaron tanto en SSI como en NSSI a diferencia de lo encontrados por otros autores que comunicaron que no hallaron expresión de PDGFR en NSSI (Hendrick, 1999). Estas diferencias podrían deberse a variantes en las metodologías utilizadas para detectar el receptor. Hendrick y su grupo utilizaron la técnica de avidina-biotina, mientras que en este estudio se utilizó la del polímero marcado (EnVision HRP ®, DakoCytomation, Carpinteria, California) para la detección de PDGFR α . Por otro lado, el trabajo en cuestión (Hendrick, 1999) no menciona el tipo de proteína

evaluada que en este estudio fue la α , el monómero β podría estar ausente en los NSSI; la evaluación de este último monómero deberá ser abordado en futuras investigaciones.

Además, los SSI expresan FGF-2 y PDGF-B. Por lo tanto, estas neoplasias coexpresan los receptores y sus ligandos, por lo que es posible que existan mecanismos autocrinos de activación, como menciona la bibliografía para estos factores de crecimiento (Hendrick, 1999; Dow y Vere White, 2000; Andrae y col., 2008; Korc y Friesel, 2009; Hendrick, 2011; Heldin, 2012).

En el caso de FGF-2 se halló también marcación nuclear, tanto del factor de crecimiento como de su receptor. Esto podría asociarse a la participación, en la patogenia de estas neoplasias, de mecanismos no canónicos que involucran la traslocación del receptor y su ligando a nivel nuclear donde promueven la transcripción (Nugent y Iozzo, 2000). Esta vía, independiente de la canónica relacionada con la función tirosinquinasa del receptor, conduciría al incremento de la actividad mitótica (Nugent y Iozzo, 2000; Neben y col., 2014) y fue involucrada en neoplasias humanas (Martin y col., 2011; Neben y col., 2014; Tsimafeyeu y col., 2017).

Como era de esperar, la expresión de FGFR-2 y PDGFR α correlacionó positivamente con el porcentaje de células proliferantes. Esto demuestra que, del mismo modo que en otras neoplasias, y en los fibroblastos normales, las vías de señalización de FGF y PDGF participan de la promoción de la proliferación celular (Nugent y Iozzo, 2000; Cao y col., 2008).

A la luz de estos resultados, se vuelve aún más relevante el estudio del uso de inhibidores de estos receptores para inhibir la capacidad proliferativa de las neoplasias. En medicina humana se encuentran en estudio inhibidores de FGFR (Liu y col., 2017; Patani y col., 2016) que se sumarán a los inhibidores de PDGFR en la lucha contra la proliferación de células neoplásicas (Kadivar y col., 2018; Fujino y col., 2018).

Tanto la prueba de correlación como la de análisis de varianza (ANOVA) mostraron asociación entre FGFR-2 y GA. La primera muestra que a mayor grado de anaplasia mayor es la expresión de FGFR-2. El análisis de varianza comprueba el comportamiento diferencial de los grupos GA I, GA II y GA III, en relación a la expresión del receptor en cuestión. El grupo con GA I expresa el receptor en menor cuantía que los otros dos grupos que no presentan diferencias significativas entre sí.

La misma asociación entre GA y PDGFR α se demuestra en la prueba de análisis de varianza. Los sarcomas con menor GA expresan menos este receptor. Por lo tanto, los SSI de menor grado de anaplasia (GA I) expresan menos los receptores de los factores de crecimiento estudiados.

Estos resultados podrían asociarse a la mayor proliferación celular comprobada en los tumores con mayor expresión de receptores (FGFR-2, PDGFR α) que se asocia, a través del IM, con la clasificación en grados de anaplasia utilizada en el presente trabajo. Esta asociación entre GA y expresión de estos receptores podría ser de utilidad al poseer potencial

predictivo de la sensibilidad de cada sarcoma en particular a la terapia con inhibidores de tirosinquinasa.

Aunque la bibliografía menciona la estimulación recíproca de la expresión de los receptores entre las familias FGF y PDGF en las células vasculares (Cao y col., 2008), esto pareciera no ocurrir en las células neoplásicas de los SSI, ya que no se halló correlación entre FGFR-2 y PDGFR α . Para evaluar esta hipótesis, sería necesario, en un futuro, estudiar si existe asociación entre la expresión de FGF-2 y PDGFR α , y entre PDGF-B y FGFR-2.

La cantidad de vasos por campo correlacionó positivamente con COX-2, a mayor expresión de COX-2 mayor cantidad de vasos por campo. Este efecto podría explicarse a través del potencial proangiogénico de los mediadores inflamatorios sintetizados en la vía de COX-2 (Williams y col., 1999; Greenhough y col., 2009). Las prostaglandinas generadas en esta vía participan en la formación de vasos tanto en el desarrollo ontogénico como en la progresión tumoral (Williams y col., 1999). A partir de estos datos, puede postularse que los inhibidores de COX-2 utilizados en protocolos quimioterápicos permitirían obtener un efecto antiangiogénico con drogas de baja toxicidad (King y col., 2012; Kongara y Chambers, 2018).

No se detectó asociación entre la expresión de COX-2 y los receptores de los factores de crecimiento (FGFR-2 y PDGFR α). No se hallaron estudios

que vincularan estas variables en SSI, por lo que no es posible comparar estos resultados con otros previos.

La cantidad de vasos por campo correlacionó inversamente con PDGFR α , El receptor, que se expresó en células neoplásicas, no fue detectado en vasos sanguíneos, por lo tanto, no es esperable un efecto directo de este receptor sobre la angiogénesis. Sí se comprobó su vinculación con la proliferación de las células tumorales de los SSI. Podría explicarse la relación inversa pensando que a mayor proliferación de células neoplásicas (que expresan gran cantidad de PDGFR α), no asociada a la mayor angiogénesis, aumentaría el número de células neoplásicas en defecto del número de vasos por unidad de área (campo).

El aporte de nutrientes es esencial para la viabilidad del tejido neoplásico, un adecuado aporte sanguíneo proporciona a las células tumorales un ambiente propicio para su supervivencia y multiplicación (Cullen y col., 2002), esto podría explicar los resultados obtenidos en relación a las variables vasculares y el porcentaje de células proliferantes. Este último, se correlacionó positivamente con el área vascular y la densidad vascular.

Sorprendentemente, el área vascular por campo y la densidad vascular por campo se correlacionaron positivamente con el tiempo de supervivencia. Parámetros vasculares como la densidad vascular y la densidad microvascular fueron considerados de valor pronóstico tanto en neoplasias humanas como en animales domésticos (Luong y col., 2006; Nowak y col., 2017; Ma y col., 2017; Álvarez Martín y col., 2018); se asociaron a menor

sobrevida (Nowak y col., 2017) y a mayor riesgo de enfermedad metastásica (Luong y col., 2006; Nowak y col., 2017; Álvarez Martín y col., 2018). Será necesario profundizar en su estudio para corroborar su valor pronóstico en SSI. Para esto será fundamental evaluar la calidad de los vasos que determina su funcionalidad, y por lo tanto, su capacidad para influir en la progresión tumoral. Algunos autores proponen que la expresión anómala de FGF y PDGF de origen tumoral, cuya expresión se comprobó en SSI, llevaría a la formación de una red vascular primitiva poco funcional (Cao y col., 2008).

Anexo IV

Tabla ñ. ANOVA Bayesiano con prueba posterior, desarrollado en R y WinBUGS (Risso y Risso, 2017). Variables GA y FGFR-2

| Grupo | | | | | | | |
|-------|---------|--------|----|---------|---------|---|--------|
| (GA) | Mp | Dsp | N | LI025 | LS0975 | S | Prueba |
| 1 | 5,8676 | 3,2162 | 18 | -0,3814 | 12,1702 | a | Z |
| 2 | 11,5927 | 2,3893 | 32 | 6,929 | 16,18 | b | Z |
| 3 | 15,0874 | 6,7941 | 4 | 1,6137 | 28,4412 | b | Z |

Grupo = grupo.

GA= grado de anaplasia.

mp = media posterior.

dsp = desvío estándar posterior.

n = n de la muestra.

LI025 = Límite inferior del Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

LI075 = Límite superior del Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

S = significación.

Prueba = Prueba de *pos hoc* Z bayesiana.

Tabla o. ANOVA Bayesiano con prueba posterior, desarrollado en R y WinBUGS (Risso y Risso, 2017). Variables GA y PDGFR α

| Grupo | | | | | | | |
|-------|---------|--------|----|---------|---------|---|--------|
| GA | Mp | Dsp | N | LI025 | LS0975 | S | Prueba |
| 1 | 56,4051 | 2,7942 | 18 | 50,98 | 61,88 | a | Z |
| 2 | 58,9345 | 2,0758 | 32 | 54,88 | 62,92 | b | Z |
| 3 | 61,8868 | 5,9026 | 4 | 50,1797 | 73,4812 | b | Z |

Grupo = grupo.

GA= grado de anaplasia.

mp = media posterior.

dsp = desvío estándar posterior.

n = n de la muestra.

LI025 = Límite inferior del Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

LI075 = Límite superior del Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

S = significación.

Prueba = Prueba de *pos hoc* Z bayesiana.

Tabla p. ANOVA Bayesiano con prueba posterior, desarrollado en R y WinBUGS (Risso y Risso, 2017). Variables GI y FGFR-2

| Grupo | | | | | | | |
|-------|---------|--------|----|--------|---------|---|--------|
| GI | Mp | Dsp | N | LI025 | LS0975 | S | Prueba |
| 1 | 9,1969 | 4,6685 | 9 | 0,1262 | 18,35 | a | Z |
| 2 | 9,8955 | 2,5761 | 29 | 4,868 | 14,84 | a | Z |
| 3 | 10,4137 | 3,4869 | 16 | 3,4988 | 17,2607 | a | Z |

Grupo = grupo.

GI= grado de inflamación.

mp = media posterior.

dsp = desvío estándar posterior.

n = n de la muestra.

LI025 = Límite inferior del Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

LI075 = Límite superior del Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

S = significación.

Prueba = Prueba de *pos hoc* Z bayesiana.

Tabla q. ANOVA Bayesiano con prueba posterior, desarrollado en R y WinBUGS (Risso y Risso, 2017). Variables GI y PDGFR α

| Grupo | | | | | | | |
|-------|---------|--------|----|---------|---------|---|--------|
| GI | Mp | Dsp | N | LI025 | LS0975 | S | Prueba |
| 1 | 57,1666 | 2,9826 | 16 | 51,37 | 63,0102 | a | Z |
| 2 | 57,6788 | 3,9389 | 9 | 49,99 | 65,24 | a | Z |
| 3 | 59,1115 | 2,2062 | 29 | 54,7397 | 63,4502 | a | Z |

Grupo = grupo.

GI= grado de inflamación.

mp = media posterior.

dsp = desvío estándar posterior.

n = n de la muestra.

LI025 = Límite inferior del Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

LI075 = Límite superior del Intervalo de Credibilidad Bayesiano.

S = significación.

Prueba = Prueba de *pos hoc* Z bayesiana.

Tabla r. Matriz de correlación Bayesiana (<https://jasp-stats.org/>)

| Variables | | Pearson cc | p-value ⁽¹⁾ |
|-----------|-------|------------|------------------------|
| FGFR-2 | Sexo | -0,124 | 0,8110 |
| FGFR-2 | GA | 0,278 | 0,0210 |
| FGFR-2 | GI | -0,027 | 0,5760 |
| FGFR-2 | COX-2 | 0,184 | 0,0920 |
| FGFR-2 | EMD | -0,153 | 0,4970 |
| FGFR-2 | TPR | -0,221 | 0,4300 |
| FGFR-2 | NR | -0,086 | 0,7110 |
| FGFR-2 | Tsd | 0,165 | 0,5410 |
| FGFR-2 | Rsn | 0,262 | 0,2510 |

(1) P > 0.05 = no hay correlación significativa.

Pearson cc = coeficiente de correlación.

p-value = valor de P.

GA= grado de anaplasia.

GI= grado de inflamación

FGFR-2=Porcentaje de expresión de FGFR-2.

COX-2= Porcentaje de expresión de COX-2.

EMD = Edad al momento del diagnóstico clínico en años

TPR = Tiempo promedio entre recidivas en días

NR = número de recidivas

Tsd = t de sobrevivida en días

Rsn = recidiva, si - no

Tabla s. Matriz de correlación Bayesiana (<https://jasp-stats.org/>)

| Variables | | Pearson cc | p-value ⁽¹⁾ |
|----------------|-------|------------|------------------------|
| PDGFR α | Sexo | 0,056 | 0,3440 |
| PDGFR α | GA | 0,137 | 0,1610 |
| PDGFR α | GI | 0,066 | 0,3180 |
| PDGFR α | COX-2 | 0,21 | 0,0630 |
| PDGFR α | EMD | -0,271 | 0,1120 |
| PDGFR α | TPR | -0,052 | 0,4270 |
| PDGFR α | NR | 0,018 | 0,5310 |
| PDGFR α | Tsd | 0,225 | 0,7990 |
| PDGFR α | Rsn | 0,091 | 0,6520 |

(1) P > 0.05 = no hay correlación significativa.

Pearson cc = coeficiente de correlación.

p-value = valor de P.

GA= grado de anaplasia.

GI= grado de inflamación

PDGFR α = Porcentaje de expresión de PDGFR α .

COX-2= Porcentaje de expresión de COX-2.

EMD = Edad al momento del diagnóstico clínico en años

TPR = Tiempo promedio entre recidivas en días

NR = número de recidivas

Tsd = t de sobrevida en días

Rsn = recidiva, si – no

Tabla t. Matriz de correlación Bayesiana (variables vasculares) (<https://jasp-stats.org/>)

| Variables | | Pearson cc | p-value ⁽¹⁾ |
|-----------|----------------|------------------|------------------------|
| Vpc | PCP | -0,123 | 0,1890 |
| Vpc | COX-2 | 0,255 | 0,0310 |
| Vpc | FGFR-2 | -0,007 | 0,4790 |
| Vpc | PDGFR α | -0,242 | 0,0390 |
| Av | PCP | 0,303 | 0,0130 |
| Av | COX-2 | 0,077 | 0,2910 |
| Av | FGFR-2 | 0,033 | 0,4060 |
| Av | PDGFR α | 0,062 | 0,3280 |
| Avc | PCP | 0,252 | 0,0330 |
| Avc | COX-2 | 0,203 | 0,0710 |
| Avc | FGFR-2 | 0,066 | 0,3170 |
| Avc | PDGFR α | -0,023 | 0,5660 |
| Dvpc | PCP | 0,252 | 0,0330 |
| Dvpc | COX-2 | 0,203 | 0,0710 |
| Dvpc | FGFR-2 | 0,066 | 0,3170 |
| Dvpc | PDGFR α | -0,023 | 0,5660 |
| Vpc | GA | -0,084 | 0,7260 |
| Vpc | GI | 0,09 | 0,2590 |
| Vpc | Raza | NaN ^a | ----- |
| Vpc | Sexo | 0,088 | 0,2640 |
| Av | GA | -0,059 | 0,6650 |
| Av | GI | -0,055 | 0,6530 |
| Av | Raza | NaN ^a | ----- |
| Av | Sexo | 0,081 | 0,2820 |

| | | | |
|----------------|----------------|------------------|--------|
| Avc | GA | -0,153 | 0,8650 |
| Avc | GI | 0,083 | 0,2750 |
| Avc | Raza | NaN ^a | ----- |
| Avc | Sexo | -0,053 | 0,6470 |
| Dvpc | GA | -0,153 | 0,8650 |
| Dvpc | GI | 0,083 | 0,2750 |
| Dvpc | Raza | NaN ^a | ----- |
| Dvpc | Sexo | -0,053 | 0,6470 |
| FGFR-2 | PDGFR α | 0,212 | 0,0620 |
| FGFR-2 | Raza | NaN ^a | ----- |
| FGFR-2 | PCP | 0,359 | 0,0350 |
| PDGFR α | Raza | NaN ^a | ----- |
| PDGFR α | PCP | 0,305 | 0,0120 |

(1) P > 0.05 = no hay correlación significativa.

(2) NaN^a = Varianza = 0, no se realiza el análisis.

Pearson cc = coeficiente de correlación.

p-value = valor de P.

GA= grado de anaplasia.

GI= grado de inflamación

PDGFR α = Porcentaje de expresión de PDGFR α .

COX-2= Porcentaje de expresión de COX-2.

Vpc= vasos por campo

Av= área vascular

Avc= área vascular por campo

Dvpc= densidad vascular por campo

FGFR-2 = Porcentaje de expresión de FGFR-2.

PCP= Porcentaje de células proliferantes

Tabla u. Matriz de correlación Bayesiana (<https://jasp-stats.org/>)

| Variables | | Pearson cc | p-value ⁽¹⁾ |
|-----------|-----|------------|------------------------|
| Vpc | EMD | -0,042 | 0,5740 |
| Vpc | TPR | -0,017 | 0,5240 |
| Vpc | Rsn | 0,047 | 0,4200 |
| Vpc | NR | 0,361 | 0,0540 |
| Vpc | Tsd | 0,359 | 0,0860 |
| Av | EMD | -0,356 | 0,1040 |
| Av | TPR | -0,247 | 0,3740 |
| Av | Rsn | 0,099 | 0,6690 |
| Av | NR | 0,094 | 0,6860 |
| Av | Tsd | 0,28 | 0,2940 |
| Avc | EMD | -0,374 | 0,0430 |
| Avc | TPR | -0,273 | 0,8380 |
| Avc | Rsn | 0,105 | 0,3250 |
| Avc | NR | 0,13 | 0,2870 |
| Avc | Tsd | 0,448 | 0,0400 |
| Dvpc | EMD | -0,374 | 0,0430 |
| Dvpc | TPR | -0,273 | 0,1620 |
| Dvpc | Rsn | 0,105 | 0,6750 |
| Dvpc | NR | 0,13 | 0,7130 |
| Dvpc | Tsd | 0,448 | 0,0410 |

(1) $P > 0.05$ = no hay correlación significativa.

Pearson cc = coeficiente de correlación.

p-value = valor de P.

EMD = Edad al momento del diagnóstico clínico/años

TPR = Tiempo promedio entre recidivas en días

NR = número de recidivas

Tsd = t de supervivencia/días

Rsn = recidiva, si – no

Vpc= vasos por campo

Av= área vascular

Avc= área vascular por campo

Dvpc= densidad vascular por campo

Discusión general

El fibrosarcoma es el SSI más frecuente en la República Argentina, al igual que fue descrito en otros países (Hendrick, 1999; Nieto, 2003; Martano y col., 2011; Wilcocky col., 2012). También, se encontraron en menor proporción otros tumores como: sarcomas pleomórficos (HFM), oseosarcomas extraesqueléticos y mixosarcomas.

Los sarcomas estudiados presentaron alta recurrencia, en concordancia con lo comunicado por Hendrick (1999). En coincidencia con lo informado por Couto y col. (2002) y Nieto y col. (2003), las neoplasias de GA II fueron las más numerosas y la distribución en grados de anaplasia fue similar para los tumores primarios y para las recidivas (Couto y col., 2002).

Con respecto al GI, la mayoría de los sarcomas fueron de grado 3. Esto concuerda con lo encontrado por Couto y col. (2002) que manifiesta que la mayoría de las neoplasias presentaron abundante inflamación, tanto en el caso de los tumores primarios como en las recidivas. Por otra parte, no se halló asociación entre GA y GI, al igual que había sucedido en estudios previos (Couto y col., 2002).

El promedio de edad al momento del diagnóstico, hallado en el presente estudio, es mayor (9,95 años -9 años y 11 meses en encuestas-; 8,86 años -8 años y 10 meses en protocolos de remisión de muestras-) al encontrado por otros autores (8,1 años) (Hendrick y col., 1994; Goldschmidt y Hendrick, 2002) tanto si consideramos la información generada a partir de encuestas como la obtenida de los protocolos de remisión de muestras. Incluso, el

proveniente de las encuestas, es mayor que el informado para NSSI (9,2 años) (Hendrick y col., 1994; Goldschmidt y Hendrick, 2002). Esto podría deberse a que la consulta en nuestro medio se retrasa en comparación con lo que ocurre en países del primer mundo.

La hipótesis más aceptada sobre el origen de los SSI felinos propone que este tipo de neoplasias se origina de la transformación maligna de fibroblastos, inducida por la inflamación crónica generada en el sitio de inoculación (Hendrick y Dunagan, 1991; Hendrick y col., 1992; Kass y col., 1993; Goldschmidt y Hendrick, 2002; Deim y col., 2008; Wilcock y col., 2012). En concordancia con lo descrito por Magi y col. (2010) y Carneiro y col. (2018), se observó que los SSI expresan la enzima proinflamatoria COX-2. Es extraño que otros autores (Beam y col., 2003), no pudieron detectar la expresión de COX-2, pero debe señalarse que ellos utilizaron diferentes protocolos inmunohistoquímicos de los empleados en este estudio. En el presente trabajo demostramos que existe una estrecha relación entre la expresión de COX-2 y el GI en los SSI. De los resultados obtenidos, se puede concluir que la expresión de COX-2 es directamente proporcional al GI.

Los hallazgos de esta tesis muestran que la expresión de COX-2 se correlaciona positivamente con la proliferación de las células neoplásicas. Este resultado era esperable ya que la sobreexpresión de COX-2 está asociada con la proliferación celular, la invasión tumoral, la inhibición de la apoptosis, la supresión de la vigilancia inmune y la angiogénesis en las neoplasias (Williams y col., 1999; Costa y col., 2002; Rodríguez y col.,

2008). Esta enzima participa en la síntesis de múltiples derivados del ácido araquidónico, entre ellos PGE2 que está íntimamente relacionada con procesos carcinogénicos (Williams y col., 1999; O'Byrne y Dalgleish, 2001; Nieto y col., 2003; Cha y DuBois, 2007; Rodríguez y col., 2008).

Los tumores altamente indiferenciados (GA III) presentaron menor expresión de COX-2. Esto podría deberse a la pérdida de la capacidad de síntesis de sustancias que se produce en las células altamente anaplásicas (Cullen y col., 2002). COX-2 también se correlaciona significativamente, de forma inversa, con la edad al momento del diagnóstico clínico. Los estudios previos sobre expresión de COX-2 en estas neoplasias (Magi y col., 2010; Carneiro y col., 2018) no estudiaron esta variable, por lo tanto no existen datos previos para comparar los resultados de la presente tesis.

Los SSI expresan PDGFR α y FGFR-2. En nuestro trabajo encontramos que FGFR-2 y PDGFR α se expresaron tanto en SSI como en NSSI a diferencia de lo encontrado por otros autores que no hallaron expresión de PDGFR en NSSI (Hendrick, 1999). Estas diferencias podrían deberse a variaciones en las metodologías utilizadas para detectar dicho receptor.

Además, los SSI expresan FGF-2 y PDGF-B. Por lo tanto, estas neoplasias coexpresan los receptores y sus ligandos, por lo que son posibles mecanismos autocrinos de activación, como se mencionan en la bibliografía para estos factores de crecimiento tanto en SSI como en otras neoplasias (Hendrick, 1999; Dow y Vere White, 2000; Andrae y col., 2008; Korc y Friesel, 2009; Hendrick, 2011; Heldin, 2012).

El hallazgo de marca nuclear para FGF-2 y su receptor, podría asociarse a la participación de mecanismos no canónicos que involucran su traslocación a nivel nuclear donde promueven la transcripción, en la patogenia de estas neoplasias, además de la mediada por el receptor a nivel de membrana (Nugent y Iozzo, 2000). Estos mecanismos conducirían al incremento de la actividad mitótica (Nugent y Iozzo, 2000; Neben y col., 2014). Este mismo hallazgo se comunicó en neoplasias humanas (Martin y col., 2011; Neben y col., 2014; Tsimafeyeu y col., 2017).

Como era de esperar, la expresión de FGFR-2 y PDGFR α correlacionó positivamente con el porcentaje de células proliferantes. Esto demuestra que, del mismo modo que en otras neoplasias, y en los fibroblastos normales, las vías de señalización de FGF y PDGF estimulan la proliferación celular (Nugent y Iozzo, 2000; Cao y col., 2008).

Tanto con la prueba de correlación como con la de análisis de varianza se demostró asociación entre FGFR-2 y GA. La primera muestra que a mayor GA mayor es la expresión de FGFR-2. El análisis de varianza comprueba que el grupo con GA I expresa el receptor en menor cuantía que los otros dos grupos que no presentan diferencias significativas entre sí.

La misma asociación entre GA y PDGFR α se demuestra en la prueba de análisis de varianza. Los sarcomas con menor GA expresan menos este receptor. Por lo tanto, los SSI de menor GA (GA I) expresan menos los receptores de los factores de crecimiento estudiados.

La cantidad de vasos por campo correlacionó positivamente con COX-2, a mayor expresión de COX-2 mayor cantidad de vasos por campo. Este efecto podría explicarse a través del potencial proangiogénico de los mediadores inflamatorios sintetizados en la vía de COX-2 (Williams y col., 1999; Greenhough y col., 2009). Las prostaglandinas generadas en esta vía participan en la formación de vasos tanto en el desarrollo prenatal como en el cáncer (Williams y col., 1999). A partir de este resultado se postula que los inhibidores de COX-2 utilizados en protocolos quimioterápicos permitirían obtener un efecto antiangiogénico con drogas de baja toxicidad (King y col., 2012; Kongara y Chambers, 2018).

La proliferación celular se correlacionó positivamente con el área vascular y la densidad vascular. Este resultado es esperable ya que el aporte de nutrientes es esencial para la viabilidad del tejido neoplásico, un adecuado aporte sanguíneo proporciona a las células tumorales un ambiente propicio para su supervivencia y multiplicación (Cullen y col., 2002).

Conclusiones

- En Argentina, el fibrosarcoma es el tipo más frecuente de los SSI.
- El GA más frecuente es el II y es similar en las neoplasias primarias y en las recidivas.
- La mayoría de los SSI mostraron un alto GI.
- No se halló asociación entre GA y GI.
- La edad promedio al momento del diagnóstico, en Argentina, es mayor a la informada en otras regiones geográficas.
- Los SSI expresan la enzima COX-2.
- La expresión de la enzima COX-2 fue directamente proporcional al GI y al porcentaje de células proliferantes.
- Los tumores más indiferenciados expresaron menos COX-2.
- Los SSI encontrados en animales más jóvenes expresaron más COX-2.
- Los SSI expresan PDGFR α , PDGF-B, FGFR-2 y FGF-2. Esto lleva a pensar en la existencia de mecanismos autocrinos para la activación de estas vías.
- Los SSI de menor GA expresan menos PDGFR α y FGFR-2.
- La expresión de PDGFR α y FGFR-2 es directamente proporcional a la proliferación celular.
- La cantidad de vasos por campo correlaciona positivamente con la expresión de COX-2.
- El porcentaje de células proliferantes es directamente proporcional con el área y la densidad vascular.

Proyecciones

La asociación entre el GI y la expresión de COX-2 en SSI sería particularmente valiosa para predecir la expresión de COX-2. Proporcionaría una herramienta predictiva simple y económica sobre la susceptibilidad a los tratamientos con inhibidores de COX-2, para cada caso particular, ya que el grado de inflamación se establece con el procesamiento de rutina y con la tinción con hematoxilina y eosina, utilizada al momento del diagnóstico.

Por otra parte en los tumores altamente indiferenciados (DA III) disminuye la expresión de la enzima. Estos resultados podrían ser de utilidad para el diseño protocolos de tratamiento basados en el uso de inhibidores de COX-2 para los SSI. La terapia con inhibidores de COX-2 generó resultados favorables en oncología humana y veterinaria (Chay DuBois, 2007; Wang y DuBois, 2010; Barbosa De Nardi y col., 2011).

Magi y col. (2010) no hallaron asociación entre la expresión de COX-2 y el grado de anaplasia. Sin embargo, en este trabajo se determinó que los sarcomas de mayor grado expresan con menor intensidad la enzima, lo que podría hacerlos menos susceptibles a la terapia con inhibidores de la COX-2.

En el futuro, será necesario evaluar el valor pronóstico de la expresión de COX-2 y el valor terapéutico del uso de sus inhibidores en los SSI, a través de la evaluación de los protocolos terapéuticos que los incluyan, tanto para SSI como para NSSI, ya que estos también expresan COX-2. Si se verifica

la utilidad de estos inhibidores, el GA y el GI tendrían un valor predictivo con respecto a la susceptibilidad de los SSI a este tipo de tratamiento.

Si bien, el tratamiento de elección en estos casos es la cirugía con amplio margen, los protocolos que incluyen inhibidores de COX-2 podrían contribuir a reducir el tamaño del tumor previo a la cirugía, a extender el período de supervivencia en tumores no resecables, y a prolongar el período entre recidivas cuando la cirugía radical no es factible.

A la luz los resultados obtenidos en relación a los receptores de factores de crecimiento estudiados, se vuelve aún más importante el estudio del uso de sus inhibidores para inhibir la capacidad proliferativa de estas neoplasias. En medicina humana se encuentran en estudio inhibidores de FGFR (Liu y col., 2017; Patani y col., 2016) que se sumarán a los inhibidores de PDGFR en la lucha contra la proliferación de células neoplásicas (Kadivar y col., 2018; Fujino y col., 2018).

La profundización de los aspectos analizados en esta tesis, probablemente servirán para el desarrollo de estrategias que tengan como objetivos emitir un pronóstico más certero, planificar opciones terapéuticas y mejorar la sobrevida de los animales con SSI. Por otra parte, arrojarán luz sobre algunos aspectos básicos de la patogenia de una neoplasia que presenta particularidades, casi exclusivas, por su etiopatogenia.

Bibliografía

- 1) Aberdein D, Munday JS, Dyer CB, Knight CG, French AF, Gibson IR. Comparison of the Histology and Immunohistochemistry of Vaccination-site and Non-vaccination-site Sarcomas from Cats in New Zealand. N Z Vet J. 2007;55:203-210. [Online]
- 2) Alvarez Martin MJ, Esquivias López-Cuervo J, O'Valle Ravassa F, Caballero Morales T. Angiogénesis y desmoplasia en cáncer de colon. X Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. http://www.conganat.org/10congreso/trabajo.asp?id_trabajo=2052. Acceso 2 de diciembre 2018.
- 3) Andrae J, Gallini G, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. Genes Dev. 2008; 22:1276–1312. [Online]
- 4) Banerji N, Kapur V, Kanjilal S. Association of Germ-line Polymorphisms in the Feline p53 Gene with Genetic Predisposition to Vaccine-Associated Feline Sarcoma. J Heredity. 2007; 98: 421–427. [Online]
- 5) Barboza De Nardi A, Raposo-Ferreira T, Huppes RR, Dalek CR, Amorim RL. COX-2 Inhibitors for Cancer Treatment in Dogs. Pak Vet J. 2011; 31:275-279. [Online]
- 6) Bardagí M, Fondevila D, Ferrer L. Immunohistochemical Detection of COX-2 in Feline and Canine Actinic Keratoses and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. J. Comp. Path. 2012; 146:11-17. [Online]
- 7) Beam SL, Rassnick KM, Moore AS, McDonough SP. An Immunohistochemical Study of Cyclooxygenase-2 Expression in Various Feline Neoplasms. Vet Pathol. 2003; 40: 496-500. [Online]

- 8) Bolstad, WM. Introduction to Statistical Science. En: Bolstad, WM. Introduction to Bayesian statistics. 2da. Edición. New Jersey, USA, John Wiley & Sons, 2007, p. 1-12.
- 9) Bonkobara M. Dysregulation of tyrosine kinases and use of imatinib in small animal practice. Vet J. 2015; 205: 180-8. [Online]
- 10) Briscoe CM, Lipscomb TP, McKinney L. Pulmonary Metastasis of a Feline Vaccination-Site Fibrosarcoma. J Vet Diagn Invest.1998; 10:79-82. [Online]
- 11) Burton G, Mason KV. Do Postvaccinal Sarcomas Occur in Australian Cats? Aust Vet J. 1997; 75:102-108. [Online]
- 12) Campbell JID, Thompson VA. More Power 6.0 for ANOVA with relational confidence intervals and Bayesian analysis. Behav Res Methods. 2012; 44: 1255-1265. [Online]
- 13) Cannon CM. Cats, Cancer and Comparative Oncology. Vet Sci. 2015; 2: 111-126. [Online]
- 14) Cao Y, Cao R, Hedlund EM. R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. J Mol Med. 2008; 86: 785-789. [Online]
- 15) Carminato A, Vascellari M, Marchioro W, Melchiotti E, Mutinelli F. Microchip-associated Fibrosarcoma in a Cat. Vet Dermatol. 2011; 22:565-574. [Online]
- 16) Carmody Soni EE, Miller BJ, Scarborough MT, Reith J, Gibbs CP. Cyclooxygenase-2 expression is not associated with clinical outcome in synovial sarcoma. Oncol Rep. 2011; 26: 1513-1517. [Online]

- 17) Carneiro CS, Queiroz GF, Pinto AC, Dagli ML, Matera JM. (2018) Feline injection site sarcoma: immunohistochemical characteristics. J Feline Med Surg. 2018; 1:1–8. http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1098612X18774709?url_ver=Z39.88-2003&rfrid=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=crpub%3dpubmed. Acceso 30 de julio 2018.
- 18) Chang HW, Ho SY, Lo HF, Tu YC, Jeng CR, Liu CH, Wang FI, Pang VF. Vaccine-associated Rhabdomyosarcoma with Spinal Epidural Invasion and Pulmonary Metastasis in a Cat. Vet Pathol. 2006; 43: 55-58. [Online]
- 19) Cha YI, DuBois RN. NSAIDs and Cancer Prevention: Targets Downstream of COX-2. Annu Rev Med. 2007; 58: 239-252. [Online]
- 20) Chen QR, Miyaura C, Higashi S, Murakami M, Kudo I, Saito S, Hiraide T, Shibasaki Y, Suda T. Activation of Cytosolic Phospholipase A2 by Platelet-derived Growth Factor Is Essential for Cyclooxygenase-2-dependent Prostaglandin E2 Synthesis in Mouse Osteoblasts Cultured with Interleukin-1. J Biol Chem. 1997; 272: 5952-5958. [Online]
- 21) Chiou WJ, Bonin PD, Singh JP. Obligatory action of polypeptide growth factors for the IL-1-mediated prostaglandin E2 production in fibroblasts. Potential role of growth factors in modulation of tissue response to IL-1. J Immunol. 1990;145: 2155-60. [Online]
- 22) Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitão D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. J Clin Pathol. 2002; 55: 429-434. [Online]

- 23) Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, Madewell BR. Feline Vaccine-associated Fibrosarcoma: Morphologic Distinctions. Vet Pathol. 2002; 39: 33-41. [Online]
- 24) Cullen JM, Page R, Misdorp W. An Overview of Cancer Pathogenesis, Diagnosis, and Management. En: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals, 4taEdición, , Iowa, USA, Ed. Blackwell Publishing, 2002, p. 3-44.
- 25) Davidson EB, Gregory CR, Kass PH. Surgical Excision of Soft Tissue Fibrosarcomas in Cats. Vet Surg. 1997; 26: 265-269. [Online]
- 26) Dean RS, Pfeiffer DU, Adams VJ. Feline Vaccination Practices and Protocols Used by Veterinarians in the United Kingdom. Vet J. 2012; 194:113-120. [Online]
- 27) Deim Z, Pálmai N, Cserni G. Feline Vaccine-associated Fibrosarcoma Induced by Aluminium Compound in Two Cats: Short Communication. Acta Vet. Hung. 2008; 56:111–116. [Online]
- 28) Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janovitz EB. Feline Fibrosarcomas at Vaccination Sites and Non-vaccination Sites. J Comp Pathol. 1996; 114: 165-174. [Online]
- 29) Dow JK, Vere White RW. Fibroblast Growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. Urology. 2000; 55: 800-806. [Online]
- 30) Dubielzig RR, Hawkins KL, Miller PE. Myofibroblastic Sarcoma Originating at the Site of Rabies Vaccination in a Cat. J Vet Diagn Invest. 1993; 5: 637-638. [Online]

- 31) Espinosa D, Cigüenza R, Calvo E. Inflamación y Cáncer. Farmacía s/d; 11: 201-221. [\[Online\]](#)
- 32) Fujino S, Miyoshi N, Ohue M, Takahashi Y, Yasui M, Hata T, Matsuda C, Mizushima T, Doki Y, Mori M. Platelet derived growth factor receptor β gene expression relates to recurrence in colorectal cancer. Oncol Rep. 2018; 39:2178-2184. [\[Online\]](#)
- 33) Gesualdo L, Di Paolo S, Milani S, Pinzani M, Grappone C, Ranieri E, Pannarale G, Schena FP. Expression of Platelet-derived Growth Factor Receptors in Normal and Diseased Human Kidney. An Immunohistochemistry and In Situ Hybridization Study. J Clin Invest. 1994; 94:50-8. [\[Online\]](#)
- 34) Goldschmidt MH, Hendrick MJ. Tumors of the Skin and Soft Tissues. En: Meuten DJ Tumors in Domestic Animals. 4th Edition. Iowa, EEUU, Ed Blackwell Publishing, 2002, p. 45-117.
- 35) Greenhough A, Smartt HJM, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumor microenvironment. Carcinogenesis. 2009; 30: 377-386. [\[Online\]](#)
- 36) Habenicht AJR, Goerig M, Grulich J, Rothe D, Gronwald R, Loth U, Schettler G, Kommerell B, Ross R. Human Platelet-derived Growth Factor Stimulates Prostaglandin Synthesis by Activation and by Rapid De Novo Synthesis of Cyclooxygenase. J Clin Invest. 1985; 75:1381-1387. [\[Online\]](#)

- 37) Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Samuel Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CDM, Fletcher JA. PDGFRA Activating Mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors. Science. 2003; 299:708-10. [Online]
- 38) Heldin CH. Autocrine PDGF stimulation in malignancies. Ups J Med Sci. 2012; 117: 83–91. [Online]
- 39) Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ, Gliatto JM. Comparison of Fibrosarcomas that Developed at Vaccination Sites and at Nonvaccination Sites in Cats: 239 cases (1991-1992). J Am Vet Med Assoc. 1994; 205: 1425-1429.
- 40) Hendrick MJ, Brooks JJ. Postvaccinal Sarcomas in the Cat: Histology and Immunohistochemistry. Vet Pathol. 1994; 31: 126-129.
- 41) Hendrick MJ, Dunagan CA. Focal Necrotizing Granulomatous Panniculitis Associated with Subcutaneous Injection of Rabies Vaccine in Cats and Dogs: 10 cases (1988-1989). J Am Vet Med Assoc. 1991. 198: 304-305. [Online]
- 42) Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, Wang YY, Somlyo AP. Postvaccinal Sarcomas in the Cat: Epidemiology and Electron Probe Microanalytical Identification of Aluminum. Cancer Res. 1992; 52: 5391-5394. [Online]
- 43) Hendrick MJ, Goldschmidt MH. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? J Am Vet Med Assoc. 1991; 5: 968. [Online]
- 44) Hendrick MJ. Musings on feline injection site sarcomas. Vet J. 2011; 188:130-131. [Online]

- 45) Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore FM, Vos JH, Walder EJ. Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. En: World Health Organization International Classification of Tumors in Domestic Animals. 2nda Edición, Washington DC, USA, Ed. Armed Forces Institute of Pathology, 1998, p. 15-60.
- 46) Hendrick MJ. Feline vaccine-associated sarcomas. Cancer Invest. 1999; 17: 273-7. [Online]
- 47) Hendrick, MJ. Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues. En: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals, 5ta Edición, , Iowa, USA, Ed. Wiley Blackwell, 2017, p. 142-175.
- 48) Hershey AE, Dubielzig RR, Padilla ML, Helfand SC. Aberrant p53 Expression in Feline Vaccine-associated Sarcomas and Correlation with Prognosis. Vet Pathol. 2005; 42:805-811. [Online]
- 49) Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, Shofer FS, Vail DM. Prognosis for Presumed Feline Vaccine-associated Sarcoma after Excision: 61 cases (1986-1996). J Am Vet Med Assoc. 2000; 216: 58-61. [Online]
- 50) Hughes, SE. Differential Expression of the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Multigene Family in Normal Human Adult Tissues. J Histochem Cytochem. 1997; 45: 1005–1019. [Online]
- 51) Iqbal N, Iqbal N . Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. Chemother Res Pract. 2014; 2014: 1-9. [Online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055302/pdf/CHERP2014-357027.pdf>. Acceso 2 de abril de 2019.

- 52) Jang JH, Shin KH, Park JG.. Mutations in Fibroblast Growth Factor Receptor 2 and Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Genes Associated with Human Gastric and Colorectal Cancers. *Cancer Res.* 2001; 61: 3541–3543.[Online]
- 53) Jelínek F. Postinflammatory Sarcoma in Cats. *ExpToxicol Pathol.* 2003; 55:167-239. [Online]
- 54) Jeske YW, Ali S, Byron SA, Gao F, Mannel RS, Ghebre RG, DiSilvestro PA, Lele SB, Pearl ML, Schmidt AP, Lankes HA, Ramirez NC, Rasty G, Powell M, Goodfellow PJ, Pollock PM. FGFR2 mutations are associated with poor outcomes in endometrioid endometrial cancer: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2017; 145: 366-373. [Online]
- 55) Kadivar A, Ibrahim Noordin M, Aditya A, Kamalidehghan B, Davoudi ET, Sedghi R, Akbari Javar H. Antiproliferative effects of imatinib mesylate on ZR 75 1 and MDA MB 231 cell lines via PDGFR β , PDGF BB, c Kit and SCF expression. *Int J Mol Med.* 2018; 42: 414-424. [Online]
- 56) Kass PH, Barnes WG Jr, Spangler WL, Chomel BB, Culbertson MR. Epidemiologic Evidence for a Causal Relation Between Vaccination and FibrosarcomaTumorigenesis in Cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1993; 203: 396-405.
- 57) Khan KNM, Stanfield KM, Trajkovic D, Knapp DW. Expression of Cyclooxygenase-2 in Canine Renal Cell Carcinoma. *Vet Pathol.* 2001; 38: 116-119. [Online]

- 58) Katayama R, Huelsmeyer MK, Marr AK, Kurzman ID, Thamm DH, Vail DM. Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. Cancer Chemother Pharmacol. 2004; 54: 25-33. [Online]
- 59) King JN, Hotz R, Reagan EL, Roth DR, Seewald W, Lees P. Safety of oral robenacoxib in the cat. J Vet Pharmacol Ther. 2012;35: 290-300. [Online]
- 60) Kongara K, Chambers JP. Robenacoxib in the treatment of pain in cats and dogs: safety, efficacy, and place in therapy. Vet Med (Auckl). 2018;9: 53-61. [Online]
- 61) Korc M, Friesel RE. The Role of Fibroblast Growth Factors in Tumor Growth. Curr Cancer Drug Targets. 2009; 9: 639–651. [Online]
- 62) Lavalle GE, Bertagnolli AC, Tavares WLF, Cassali GD. Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. Vet Pathol. 2009, 46:1274-1280. [Online]
- 63) Liu H, Ai J, Shen A, Chen Y, Wang X, Peng X, Chen H, Shen Y, Huang M, Ding J, Geng M. c-Myc Alteration Determines the Therapeutic Response to FGFR Inhibitors. Clin Cancer Res. 2017; 23: 974-984. [Online]
- 64) Luong RH, Baer KE, Craft DM, Ettinger SN, Scase TJ, Bergman PJ. Prognostic significance of intratumoral microvessel density in canine soft-tissue sarcomas. Vet Pathol. 2006; 43: 622-31. [Online]

- 65) Ma G, Zhang J, Jiang H, Zhang N, Zhu Y, Deng Y, Zhou Q. Microvessel density as a prognostic factor in esophageal squamous cell cancer patients: A meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2017; 96: e7600. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5521944/pdf/medi-96-e7600.pdf>. Acceso 8 de enero de 2019.
- 66) MacEwen EG, Powers BE, Macy D, Withrow SJ. Soft Tissue Sarcomas. En: Withrow SJ, MacEwen EG. Small Animal Clinical Oncology. 3th Edition. Philadelphia, EEUU, W.B. Ed Saunders Company, 2001, p. 283-304.
- 67) Madewell BR, Griffey SM, McEntee MC, Leppert VJ, Munn RJ. Feline Vaccine-associated Fibrosarcoma: An Ultrastructural Study of 20 tumors (1996-1999). Vet Pathol. 2001; 38: 196-202. [Online]
- 68) Magi GE, Mari S, Renzoni G, Rossi G. Immunohistochemical Expression of COX-2 in Feline Injection Site Sarcoma. Vet Pathol. 2010; 4: 340. [Online]
- 69) Martano M, Morello E, Buracco P. Feline injection-site sarcoma: Past, present and future perspectives. Vet J. 2011; 188: 136-141. [Online]
- 70) Martin AJ, Grant A, Ashfield AM, Palmer CN, Baker L, Quinlan PR, Purdie CA, Thompson AM, Jordan LB, Berg JN. FGFR2 protein expression in breast cancer: nuclear localization and correlation with patient genotype. BMC Res Notes. 2011; 4: 72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3073906/pdf/1756-0500-4-72.pdf>. Acceso 2 de abril de 2019.

- 71) Martin M. Vaccine-associated fibrosarcoma in a cat. Can Vet J.2003; 44:660-663. [Online]
- 72) Munday JS, Banyay K, Aberdein D, French AF. Development of an Injection Site Sarcoma Shortly After Meloxicam Injection in an Unvaccinated Cat. J Feline Med Surg. 2011; 13:988-1079. [Online]
- 73) Munday JS, Stedman NL, Richey LJ. Histology and Immunohistochemistry of Seven Ferret Vaccination-site Fibrosarcomas. Vet Pathol. 2003; 40: 288-293. [Online]
- 74) Neben CL, Idoni B, Salva J E, Tuzon CT, Rice JC, Krakow D, Merrill AE. Bent bone dysplasia syndrome reveals nucleolar activity for FGFR2 in ribosomal DNA transcription. Hum Mol Genet. 2014; 23: 5659-5671. [Online]
- 75) Newman SJ, Mrkonjich L. Cyclooxygenase-2 expression in feline pancreatic adenocarcinomas. J Vet Diagn Invest. 2006; 18: 590-593. [Online]
- 76) Nieto A, Sánchez MA, Martínez E, Rollán E. Immunohistochemical Expression of p53, Fibroblast Growth Factor-b, and Transforming Growth Factor- α in Feline Vaccine-associated Sarcomas. Vet Pathol. 2003; 40: 651-658. [Online]
- 77) Nowak A, Grzegorzolka J, Paprocka M, Piotrowska A, Rys J, Matkowski R, Dziegiel P. Nestin-positive microvessel density is an independent prognostic factor in breast cancer. Int J Oncol. 2017; 51: 668-676. [Online]

- 78) Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. The International J Biochem Cell Biol. 2000; 32: 115-120. [Online]
- 79) O'Byrne KJ, Dalgleish AG. Chronic Immune Activation and Inflammation as the Cause of Malignancy. Brit J Cancer. 2001; 85, 473–483. [Online]
- 80) Patani H, Bunney TD, Thiagarajan N, Norman RA, Ogg D, Breed J, Ashford P, Potterton A, Edwards M, Williams SV, Thomson GS, Pang CS, Knowles MA, Breeze AL, Orenco C, Phillips C, Katan M. Landscape of activating cancer mutations in FGFR kinases and their differential responses to inhibitors in clinical use. Oncotarget. 2016; 7:24252-68. [Online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5029699/pdf/oncotarget-07-24252.pdf> Acceso 1 de enero de 2019.
- 81) Perlmann E, Rodarte-Almeida ACV, Albuquerque L, Safatle AMV, Pigatto JAT, Barros PSM. Feline Intraocular Sarcoma Associated with Phthisis Bulbi. Arg. Bras. Med. Vet. Zootec. 2011; 63: 591-594. [Online]
- 82) Poles GC, Clark DE, Mayo SW, Beierle EA, Goldfarb M, Gow KW, Goldin A, Doski JJ, Nuchtern JG, Vasudevan SA, Langer M. Colorectal carcinoma in pediatric patients: A comparison with adult tumors, treatment and outcomes from the National Cancer Database. J Pediatr Surg. 2016;51:1061-6. [Online] [https://www.jpedsurg.org/article/S0022-3468\(15\)00757-5/fulltext](https://www.jpedsurg.org/article/S0022-3468(15)00757-5/fulltext) Acceso 2 de abril de 2019.
- 83) Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. Vet Pathol. 2005; 42: 405-26. [Online]
- 84) Ramos-Vara JA, Miller MA. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—

- The Red, Brown, and Blue Technique. Vet Pathol. 2014; 51:42-87. [Online]
- 85) Risso MA, Risso P. (2017) Capítulo I. El teorema de Bayes. En: Risso MA, Risso P. Una Introducción a la Estadística Bayesiana: Uso de Lenguaje R y WinBUGS, 1ra Edición, La Plata, Argentina, Ed. Vuelta a casa, 2017, p. 113-126.
- 86) Robledo Martín J. Diseño de muestreo (II). Nure Investigación. 2005; 12: (s/d). [Online] [file:///C:/Users/olgaandrea/Downloads/214-Texto%20del%20art%C3%ADculo-845-1-10-20150603%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/olgaandrea/Downloads/214-Texto%20del%20art%C3%ADculo-845-1-10-20150603%20(1).pdf). Acceso 2 de abril de 2019.
- 87) Rodríguez NI, Hoots WK, Koshkina NV, Morales-Arias JA, Arndt CA, Inwards CY, Hawkins DS, Munsell MF, Kleinerman ES. COX-2 Expression Correlates With Survival in Patients With Osteosarcoma Lung Metastases. J Pediatr Hematol Oncol. 2008; 30: 507-512. [Online]
- 88) Rudmann DG, Van Alstine WG, Doddy F, Sandusky GE, Barkdull T, Janovitz EB. Pulmonary and Mediastinal Metastases of a Vaccination-site Sarcoma in a Cat. Vet Pathol. 1996; 33: 466-469. [Online]
- 89) Tsimafeyeu I, Naumova A, Stepanova E, Khasanova A, Varlamov I, Wynn N, Snegovoy A, Demidov LV. FGFR2 expression to predict survival outcome in patients with metastatic papillary renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2017; 34: 506-506. [Online]
- 90) Sandler I, Teeger M, Best S. Metastatic Vaccine Associated Fibrosarcoma in a 10-year-old Cat. Can Vet J. 1997; 38: 374. [Online]

- 91) Sangüesa Nebot MJ, Cabanes Soriano F, Valverde Mordt C. Osteosarcoma extraesquelético. Caso clínico. Revista Española De Cirugía Osteoarticular. 2007; 42:88-92. [Online]
- 92) Sharma-Walia N, Patel K, Chandran K, Marginean A, Bottero V, Kerur N, Paul AG.. COX-2/PGE2: molecular ambassador of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus oncoprotein-v-FLIP. Oncogenesis. 2012; 1-21. [Online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412643/pdf/oncsis20125a.pdf>. Acceso 2 de abril de 2019.
- 93) Sharma-Walia N, Paul AG, Bottero V, Sadagopan S, Veetil MV, Kerur N, Chandran B. Kaposi's Sarcoma Associated Herpes Virus (KSHV) Induced COX-2: A Key Factor in Latency, Inflammation, Angiogenesis, Cell Survival and Invasion. PLoS Pathog. 2010; 6: 1-30. [Online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2820536/pdf/ppat.1000777.pdf>. Acceso 2 de abril de 2019.
- 94) Shaw SC, Kent MS, Gordon IK, Collins CJ, Greasby TA, Beckett LA, Hammond GM, Skorupski KA. Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1990-2006). J Am Vet Med Assoc. 2009; 234: 376-380. [Online]
- 95) Thompson KG, Pool RR. Tumors of Bones. En: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals, 4ta Edición, , Iowa, USA, Ed. Blackwell Publishing, 2002, p. 245-317.
- 96) Thompson KG, Dittmer KE. Tumors of Bone. En: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals, 5ta Edición, , Iowa, USA, Ed. Wiley Blackwell, 2017, p. 356-424.

- 97) Velghe AI, Van Cauwenberghe S, Polyansky AA, Chand D, Montano-Almendras CP, Charni S, Hallberg B, Essaghir A, Demoulin JB. PDGFRA alterations in cancer: characterization of a gain-of-function V536E transmembrane mutant as well as loss-of-function and passenger mutations. Oncogene. 2014; 33:2568-76. [Online]
- 98) Wang D, DuBois R. The Role of COX-2 in Intestinal Inflammation and Colorectal Cancer. Oncogene. 2010; 29: 781-788. [Online]
- 99) Wilcock B, Wilcock A, Bottoms K. Feline postvaccinal sarcoma: 20 years later. Can Vet J. 2012; 53: 430–434. [Online]
- 100) Williams C, Mann M, DuBois R. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. Oncogene 1999; 18: 7908-7916. [Online]
- 101) Wolf I, O’Kelly J, Rubinek T, Tong M, Nguyen A, Lin BT, Tai HH, Karlan BY, Koeffler HP. 15-Hidroxyprostaglandin Dehydrogenase Is a Tumor Suppressor of Human Breast Cancer. Cancer Res. 2006; 66: 7818-7823. [Online]
- 102) Woodward KN. Origins of Injection-Site Sarcomas in Cats: The posible Role of Chronic Inflammation-A Review. ISRN Vet Sci. 2011; 2011: 1-16. [Online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3658838/pdf/ISRN.VS2011-210982.pdf>. Acceso 30 de julio 2018.
- 103) Xu Z, Choudhary S, Voznesensky O, Mehrotra M, Woodard M, Hansen M, Herschman H, Pilbeam C. Overexpression of Cox-2 in Human Osteosarcoma Cells Decreases Proliferation and Increases Apoptosis. Cancer Res. 2006; 66:6657-6664. [Online]

