

ANDRESSA GIANOTTI CAMPOS

Esplenomegalias em cães: estudo retrospectivo e análise imunohistoquímica  
do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

São Paulo  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANDRESSA GIANOTTI CAMPOS

Esplenomegalias em cães: estudo retrospectivo e análise imunohistoquímica  
do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de mestre em Ciências.

**Departamento:**

Cirurgia

**Área de Concentração:**

Clínica Cirúrgica Veterinária

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julia Maria Matera

São Paulo

2010

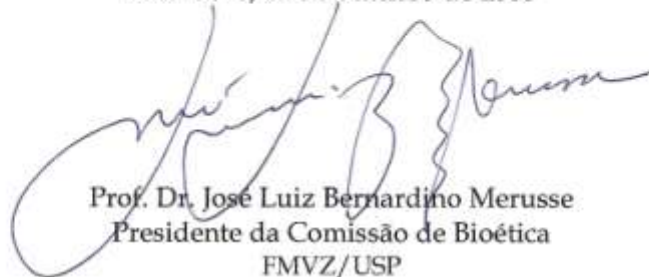


## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo retrospectivo das afecções esplênicas em cães submetidos a esplenectomia", protocolado sob o nº1488/2008, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Júlia Maria Matera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01/10/08.

We certify that the Research "Retrospective study of splenic diseases in dogs after splenectomy", protocol number 1488/2008, under the responsibility Profa. Dra. Júlia Maria Matera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/01/08.

São Paulo, 02 de outubro de 2008



Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP



## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão tecidual de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nas formações esplênicas em cães", protocolado sob o nº1715/2009, utilizando número indeterminado de cães, sob a responsabilidade da Profa Dra Júlia Maria Matera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09 de setembro de 2009.

We certify that the Research "Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in canine splenic disease", utilizing indeterminate number of dogs, protocol number 1715/2009, under the responsibility Profa Dra Júlia Maria Matera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/09/09.

São Paulo, 10 de setembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CAMPOS, Andressa Gianotti.

Título: Esplenomegalias em cães: estudo retrospectivo e análise imunohistoquímica do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

*“Há quem diga que todas as noites são de sonhos.  
Mas há também quem garanta que nem todas, só as  
de verão. No fundo, isto não tem muita importância.  
O que interessa mesmo não é a noite em si, são os  
sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em  
todos os lugares, em todas as épocas do ano,  
dormindo ou acordado.”*

*William Shakespeare*

## DEDICATÓRIA

*Aos meus **pais**, pelo apoio irrestrito em todos os  
momentos de minha vida.*



## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me proporcionar todas as oportunidades que tenho em minha vida;

À minha mãe **Irene** e meu pai **Ary**, meu marido **Beto**, meu irmão **André**, minha cunhada **Juliana**, minha sobrinha **Bianca** e minha **Nina** querida, pelo apoio, pela torcida e pelo amor incondicional que recebo todos os dias;

À querida professora **Julia Maria Matera**, muito obrigada pela confiança e por todo apoio e orientação oferecidos não só durante o mestrado e sim, ao longo de quase doze anos de convivência no Serviço de Cirurgia;

Ao amigo **Daniel Sanches** por me ajudar nas “imunoss” e por sempre acreditar (e me fazer acreditar) que eu era capaz;

Às queridas médicas veterinárias **Patrícia Castro**, **Sandra Rosner**, **Tatiana Soares** e **Viviane Galeazzi** por dividirem comigo o “mundo” cirúrgico do HOVET.

Aos queridos enfermeiros **Clédson Lélis**, **Jesus dos Anjos** e **Otávio dos Santos**, por toda dedicação e apoio;

Aos professores, veterinários, pós-graduandos e técnicos do **Departamento de Patologia**, pela ajuda na execução da parte laboratorial;

Aos funcionários do **guichê e administração**, pela atenção prestada à solicitação dos prontuários;

Aos funcionários da **biblioteca**, por todo suporte na execução desta dissertação;

Aos **pós-graduandos** do Departamento de Cirurgia pela convivência e amizade;

Aos amigos **Ney** e **Alessandra**, por sempre atenderem com tanto carinho, a todas as minhas solicitações;

Ao meu avô **Domingos**, o querido Minguito, por me ensinar a gostar dos animais desde cedo;

Aos meus **padrinhos**, **sogros**, **cunhados** e **sobrinhos**, por fazerem parte da minha vida de maneira tão especial;

Aos queridos amigos **Ariane**, **Daniel**, **Erik**, **Jorge**, **Juliana**, **René** e **Rogério**, pela amizade sempre presente, mesmo na ausência.

## RESUMO

CAMPOS, A. G. **Esplenomegalias em cães: estudo retrospectivo e análise imunohistoquímica do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).** [Splenomegaly in dogs: retrospective study and immunohistochemical analysis of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)]. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - São Paulo - 2010.

A formação de novos vasos sanguíneos é fundamental para o crescimento tumoral e a disseminação metastática, sendo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) uma das chaves reguladoras deste processo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão imunohistoquímica de VEGF nos hemangiossarcomas e hemangiomas esplênicos, e rever a prevalência das demais afecções esplênicas através da análise retrospectiva do diagnóstico histopatológico de cães submetidos à esplenectomia. Os resultados foram confrontados com os exames laboratoriais, as manifestações clínicas, a presença de arritmias cardíacas e de hemoperitônio. Participaram do estudo retrospectivo 109 cães atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, entre os anos de 2002 e 2009. A média de idade foi de 10 anos ( $\pm 3$ ), não foi observado predileção sexual. Cães sem raça definida foram os mais acometidos, com peso médio de 22 kg ( $\pm 13$ ). Cinquenta e dois por cento (57/109) dos animais foram esplenectomizados devido a afecções não neoplásicas, enquanto que 48% (52/109), por neoplasias esplênicas. Dentre estes, o diagnóstico mais freqüente foi o hemangiossarcoma, acometendo 28 (54%) animais. Os sintomas mais freqüentes foram disorexia, apatia e emese. Cães com neoplasias malignas apresentaram níveis de hematócrito e hemácias significativamente menores que os acometidos por massas benignas. Do mesmo modo, a presença de hemoperitônio, secundário à ruptura esplênica, correlacionou-se significativamente com a presença de neoplasia maligna. Arritmias cardíacas não foram fatores preditivos para a diferenciação da esplenomegalia. A avaliação imunohistoquímica da expressão tecidual de VEGF foi realizada em 23 hemangiossarcomas e 7 hemangiomas, revelando-se significativamente maior nas neoplasias malignas. Tal resultado sugere que a expressão deste fator pode estar

relacionada à proliferação maligna observada nos hemangiossarcomas.

Palavras-chave: Cães. Baço. Imunohistoquímica. Fator de Crescimento Endotelial Vascular. VEGF

## ABSTRACT

CAMPOS, A. G. **Splenomegaly in dogs: retrospective study and immunohistochemical analysis of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).** [Esplenomegalias em cães: estudo retrospectivo e análise imunohistoquímica do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)]. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - São Paulo - 2010.

New blood vessel formation is a fundamental event in the process of tumor growth and metastatic dissemination, being the vascular endothelial growth factor (VEGF) one of the key regulators of this process. The aim of this study was evaluate the VEGF immunohistochemical expression in splenic hemangiosarcomas and hemangiomas, and review the prevalence of canine splenic disorders through retrospective analysis of histological diagnosis after splenectomy. The results were confronted with laboratory findings, clinical signs and presence of cardiac arrhythmia and hemoperitoneum. A hundred nine dogs were included in the retrospective study at Veterinary Hospital of School of Veterinary Medicine, University of Sao Paulo, between 2002 and 2009. The average age was 10 year  $\pm$  3, without sexual predilection. Mix breeds were the most frequent, and average weigh was 22kg  $\pm$  13. Overall, 52% (57/109) of dogs were splenectomized for nonneoplastic disease, although 48% (52/109) were splenectomized for neoplasia. Among these dogs the most common diagnosis was hemangiossarcoma (28 dogs, 54%). Frequently clinical signs included anorexia, lethargy and vomiting. Dogs with malignant neoplasia had significantly lower red blood cells counts and packed cell volume compared with values for dogs with benign masses. Similarly, hemoperitoneum secondary to splenic rupture had a significant correlation with malignant tumor. Cardiac arrhythmia was not useful in differentiating dogs with splenomegaly. Expression of vascular endothelial growth factor was made by immunohistochemical analyses in 23 hemangiosarcomas and 7 hemangiomas being significantly higher in malignant tumor. These data suggest that VEGF expression may contribute to malignant proliferation of hemangiossarcoma.

Key-words: Dogs. Spleen. Immunohistochemical. Vascular Endothelial Growth Factor. VEGF

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografia de neoplasias esplênicas em cães: (1A) Hemangioma, mostrando grandes espaços vasculares circundados por camada de células endoteliais alinhadas entre os finos septos colagênicos. HE. Barra= 20 $\mu$ m. (1B) Hemangioma, revelando fraca marcação citoplasmática nas células inflamatórias. IHQ. Barra= 20 $\mu$ m. (1C) Hemangiossarcoma, mostrando células endoteliais neoplásicas agrupadas entre as trabéculas de colágeno, criando canais vasculares tortuosos e de diversos tamanhos. HE. Barra= 40 $\mu$ m. (1D) Hemangiossarcoma, revelando forte marcação citoplasmática de VEGF. IHQ. Barra= 40 $\mu$ m. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET – FMVZ/ USP – São Paulo – 2002 a 2009..... 46
- Figura 2 - Fotomicrografia de tecido de granulação cutâneo canino em cães: (2A) Marcação forte e difusa de VEGF nas células endoteliais e inflamatórias. IHQ. Barra= 20  $\mu$ m (2B). Fibroplasia e células endoteliais imaturas, ao redor de vasos sanguíneos recém formados. HE. Barra= 40  $\mu$ m. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET – FMVZ/ USP – São Paulo – 2002 a 2009..... 46

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Distribuição dos cães segundo peso - São Paulo - 2002-2009.....   | 38 |
| Tabela 2 - Distribuição dos cães segundo sexo e afecção esplênica - São Paulo - 2002 - 2009.....   | 38 |
| Tabela 3 - Distribuição das principais manifestações clínicas e suas frequências nos 109 cães acometidos por esplenomegalia - São Paulo - 2002 - 2009.....                                       | 39 |
| Tabela 4 - Distribuição dos cães segundo ausência e presença de hemoperitônio e esplenomegalia - São Paulo - 2002-2009.....  | 40 |
| Tabela 5 - Alterações no traçado do eletrocardiograma nos animais com afecções esplênicas - São Paulo - 2002 - 2009.....   | 41 |
| Tabela 6 - Distribuição dos cães, segundo presença ou ausência de alteração no traçado eletrocardiográfico e afecção esplênica. São Paulo - 2002 - 2009.....                                     | 41 |
| Tabela 7 - Comparação das características clínicas e laboratoriais dos animais com esplenomegalias benignas e neoplasias malignas - São Paulo - 2002 - 2009.....                                 | 43 |
| Tabela 8 - Expressão de VEGF nos hemangiossarcomas e hemangiomas, de acordo com a porcentagem de células positivamente marcadas - São Paulo - 2002 - 2009.....                                   | 44 |
| Tabela 9 - Comparação das características clínicas e laboratoriais dos animais acometidos por hemangioma e hemangiossarcoma esplênicos sujeitos a imunohistoquímica - São Paulo - 2002-2009..... | 45 |
| Tabela 10 - Dados epidemiológicos dos animais portadores de esplenomegalias- São Paulo - 2002 - 2009.....  | 63 |
| Tabela 11 - Parâmetros hematológicos dos animais portadores de esplenomegalias - São Paulo - 2002 - 2009.....  | 67 |
| Tabela 12 - Contagem das células que expressaram VEGF nos hemangiomas e hemangiossarcomas esplênicos, e seus respectivos valores hematológicos - São Paulo - 2002 - 2009.....                    | 71 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Gráfico 1 - | Prevalência das esplenomegalias nos animais submetidos à esplenectomia - São Paulo – 2002 - 2009..... | 35 |
| Gráfico 2 - | Distribuição das afecções esplênicas segundo faixa etária - São Paulo – 2002 - 2009.....              | 36 |
| Gráfico 3 - | Distribuição das raças segundo afecção esplênica - São Paulo – 2002 - 2009.....                       | 37 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|       |   |
|-------|---|
| FMVZ  | Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia                                 |
| USP   | Universidade de São Paulo   |
| HOVET | Hospital Veterinário  |
| VEGF  | Vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular) |
| SRD   | Sem raça definida   |
| NDN   | Nada digno de nota  |
| ECG   | Eletrocardiograma   |
| VPC   | Contração ventricular prematura   |
| HSA   | Hemangiossarcoma  |



## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                   | <b>17</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>        | <b>19</b> |
| 2.1      | O BAÇO.....                              | 19        |
| 2.2      | ESPLENOMEGALIAS.....                     | 21        |
| 2.3      | ANGIOGÊNESE TUMORAL.....                 | 24        |
| 2.4      | FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR | 25        |
| 2.4.1    | Gene do VEGF.....                        | 27        |
| 2.4.2    | Receptores.....                          | 28        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                    | <b>30</b> |
| <b>4</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>          | <b>31</b> |
| 4.1      | ESTUDO RETROSPECTIVO.....                | 31        |
| 4.2      | ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO.....            | 31        |
| 4.3      | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                 | 33        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                   | <b>34</b> |
| 5.1      | DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO.....         | 34        |
| 5.2      | IDADE.....                               | 36        |
| 5.3      | RAÇAS.....                               | 37        |
| 5.4      | PESO.....                                | 38        |
| 5.5      | SEXO.....                                | 38        |
| 5.6      | MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....              | 39        |
| 5.7      | PRESENÇA DE HEMOPERITÔNIO.....           | 40        |
| 5.8      | ELETROCARDIOGRAMA.....                   | 41        |
| 5.9      | EXAMES LABORATORIAIS.....                | 42        |
| 5.10     | IMUNOHISTOQUÍMICA – VEGF.....            | 44        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>                    | <b>47</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>                    | <b>57</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                  | <b>58</b> |
|          | <b>APÊNDICE.....</b>                     | <b>63</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Diversos povos da antiguidade designaram atribuições ao baço, muitas das quais foram recentemente comprovadas pela ciência. Na China, o baço é considerado pela medicina tradicional como importante órgão relacionado com a defesa do organismo, com o fornecimento de energia e com a digestão (MCCLUSKY et al., 1999).

Na cultura hebraica, o Midrash, livro da tradição histórica, inclui o baço entre os dez órgãos que contêm a alma. Isto provém do famoso livro do misticismo hebraico, Zohar, no qual “o baço produz o riso e a alegria”. A primeira indicação de esplenectomia também pertence à história hebraica. Na época do rei David, Adoniah tentou usurpar o trono e para isso retirou o baço de 50 soldados de sua tropa a fim de que corressem com maior velocidade. Seria de estranhar que a retirada de um órgão relacionado à depuração sangüínea e à alegria pudesse conduzir a um melhor desempenho físico. Porém, a malária e a esquistossomose eram doenças endêmicas em todo o Oriente Médio, e a esplenomegalia, presente nessas moléstias, provocava desconforto abdominal e anemia por armazenamento do sangue (MCCLUSKY et al., 1999).

Nos cães, as primeiras esplenectomias foram realizadas por volta de 1500, já comprovando que os animais poderiam sobreviver sem o baço (SPANGLER et al., 1992; TILSON, 2003).

O baço pode ser acometido por diversas afecções, desde hiperplasia nodular, hematoma, abscesso, enfarte, torção, infecção e neoplasias benignas e malignas. Dentre as últimas, o hemangiossarcoma é a mais freqüente entre os cães e certamente, a de pior prognóstico. Trata-se de um tumor de células endoteliais, altamente maligno que acomete cães de meia idade, cujo tratamento cirúrgico e quimioterápico ainda resulta em sucesso limitado (MARINO, 2000).

O conceito de angiogênese tumoral como mecanismo essencial em biologia dos tumores vem sendo discutido há tempos. Sabe-se que a própria massa tumoral regula seu processo de angiogênese, seja através da liberação de fatores angiogênicos ou da inibição de fatores antiangiogênicos. Sem angiogênese, o aporte de nutrientes torna-se restrito, limitando o crescimento tumoral. Também é componente essencial para o desenvolvimento de metástases, promovendo as vias

pelas quais as células deixam o tumor primário e atingem a circulação (RESTUCCI et al., 2002).

Um dos principais fatores associados à angiogênese é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Em seres humanos e nos animais, sua expressão encontra-se elevada em muitos tipos de tumores e tem sido proposta como indicador de prognóstico relacionado com a diminuição da sobrevida em diversos cânceres (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 2005).

Estudos apontam que a determinação sérica e/ou tecidual do VEGF pode funcionar como marcador tumoral, permitindo a avaliação da resposta à terapia além de permitir novas modalidades terapêuticas que utilizem-se de drogas antiangiogênicas no combate ao tumor e ao desenvolvimento de metástases (FERRARA; DAVIS- SMYTH, 2005; PLATT et al., 2006).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Por sua localização anatômica e funcional, o baço torna-se alvo de múltiplas desordens. Quando acometido primariamente, pode ser a razão de diversas doenças, enquanto que no acometimento secundário à afecção sistêmica, pode agir como órgão sentinela para uma determinada afecção. Através da avaliação esplênica, o clínico pode obter informações valiosas em busca do diagnóstico definitivo para o paciente.

### 2.1 O BAÇO

Nos mamíferos, o baço está localizado no quadrante superior esquerdo do abdome e possui uma rede de vasos sanguíneos aferentes e eferentes que torna esse órgão local por onde passa todo o sangue corporal. Origina-se a partir da proliferação mesenquimal no mesentério dorsal, sendo o local de maior acúmulo de mesênquima ativo no embrião (TILSON, 2003).

O baço é o maior acúmulo de tecido linfóide do organismo e está diretamente interposto entre a circulação portal e sistêmica. O tecido esplênico é parte essencial do sistema reticuloendotelial e é um dos principais sítios de produção de linfócitos, monócitos e células reticuloendoteliais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Possui uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a qual emite trabéculas que dividem o parênquima em compartimentos incompletos, com diferenças morfológicas e fisiológicas definidas. A polpa branca consiste primariamente dos linfócitos e das células do sistema retículo endotelial distribuídas ao longo do curso dos vasos arteriais e é responsável pela atividade imunológica do órgão. Zonas ricas em linfócitos T e B podem ser encontradas no interior da polpa branca (nódulos linfóides) (TILSON, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Já a polpa vermelha consiste dos capilares arteriais, pequenos vasos venosos, um retículo preenchido por macrófagos e sangue. Aqui ocorrem as funções metabólicas, como acúmulo de ferro e armazenamento de sangue (TILSON, 2003).

Uma grande quantidade de músculo liso contido na cápsula capacita o baço

canino a se contrair; ela também é responsável pela esplenomegalia observada após a administração de barbitúricos ou tranqüilizantes que resultam no relaxamento das fibras da musculatura lisa. A reserva de sangue em um baço aumentado pode representar até 30% do volume sanguíneo total. Catecolaminas endógenas ou exógenas provocam efeito inverso, de contração da musculatura lisa (COUTO, 1992).

O sangue entra no baço pela artéria esplênica, que se ramifica repetidamente dentro do parênquima. As artérias maiores são envolvidas por uma bainha fibrosa colágena, que desaparece nos ramos menores. Estes vasos, conhecidos como artérias centrais, possuem um manguito cilíndrico de tecido linfóide em torno de si, constituído principalmente por células T. Cada artéria central dá origem a uma quantidade de ramos curtos, chamadas de artérias penicilares, que terminam em pequenos capilares especiais, os capilares embainhados, de fundo cego, que não tem revestimento endotelial, e sim são cercados por agregado de macrófagos (também chamado de bainha macrofágica periarteriolar). Assim o sangue que chega por um capilar embainhado tem que atravessar a parede de macrófagos antes de entrar para os sinusóides, também chamados de seios da polpa vermelha. Dos sinusóides o sangue passa para as veias da polpa vermelha, que se agrupam e penetram nas trabéculas, formando as veias trabeculares. Estas darão origem à veia esplênica, que sai pelo hilo do baço. As veias trabeculares não têm paredes próprias, isto é, são formadas pelo tecido das trabéculas, revestidas internamente por endotélio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Dentre as funções do baço, destacam-se a hematopoiese, a filtração e fagocitose sanguínea, o remodelamento das células vermelhas, a remoção de inclusões intra-eritrocitária, o reservatório de hemácias e plaquetas, o envolvimento no metabolismo de ferro e funções imunológicas (TILSON, 2003).

Outras funções incluem a estocagem e ativação da atividade coagulante do fator VIII antigênico (fator de von Willebrand), regulação da formação, liberação ou degradação da enzima conversora da angiotensina e modulação dos níveis de nor-epinefrina plasmática e/ou atividade PGE2 renal (COUTO, 1992).

## 2.2 ESPLENOMEGALIAS

O termo ***esplenomegalia localizada*** (ou massa esplênica) é utilizado para definir o aumento focal do baço, que pode ser classificado em neoplásico ou não neoplásico (NEER, 1996). De acordo com alguns autores, 48% das lesões são classificadas como neoplásicas enquanto que 51% são não neoplásicas. Neste último grupo incluem-se hiperplasia nodular, hematoma, abscesso e enfarte (JOHNSON et al., 1989).

Considerada como uma das mais freqüentes alterações do baço, a hiperplasia nodular é composta por diversos tipos celulares incluindo tecido linfóide, hematopoiético e plasmocítico. Já o hematoma consiste de eritrócitos degenerados, fibrina organizada e hemorragia, e pode estar presente concomitantemente à hiperplasia. Estudos apontam que 80% das lesões não neoplásicas nos cães são representadas pela hiperplasia nodular e/ou hematoma (DAY et al., 1995; MORAES; O'BRIEN, 2005).

Uma variação da hiperplasia nodular é o nódulo fibrohistiocítico, que representa um tipo de proliferação linfóide de células fibrohistiocíticas e é classificada como grau intermediário entre a hiperplasia nodular e a histiocitose maligna. Raças como Cocker Spaniel, Pastor Alemão, Labrador e Golden Retriever parecem predispostos a esta alteração (SPANGLER; KASS, 1998).

Abscesso esplênico e enfarte são raros, representam menos de 1% das lesões esplênicas nos cães e usualmente são secundários a condições como torção esplênica e trombos (NEER, 1996; GINEL et al., 2001).

A neoplasia primária é uma das principais causas de esplenomegalia localizada, sendo o hemangiossarcoma o responsável por 80% dos casos em cães. Trata-se de tumor maligno, originário de células endoteliais, que exhibe comportamento biológico altamente agressivo. A prevalência em cães varia de 0,3 a 2 % de todos os tumores e a idade média no momento do diagnóstico varia de 9 a 12 anos. Comumente afeta animais de raças grandes como Pastor Alemão, Golden Retriever e Labradores, sendo que a incidência em machos parece ser maior que nas fêmeas (THAMM, 2007).

O hemangiossarcoma pode acometer qualquer tecido corporal, mas em aproximadamente 50% das vezes está localizado no baço. Metástases e infiltração

local podem ocorrer já no início da doença, e os locais mais predispostos são fígado, omento, mesentério e pulmões. Aproximadamente 15 a 25% dos cães com hemangiossarcoma esplênico apresentam também envolvimento em átrio direito (THAMM, 2007).

Pode apresentar-se como nódulo solitário ou multifocal, de diversos tamanhos, com consistência macia e contornos indefinidos. Histologicamente, o hemangiossarcoma consiste de células endoteliais pleomórficas, imaturas, formando grandes espaços preenchidos por sangue e trombos (THAMM, 2007).

Outros tipos histológicos incluem hemangioma, leiomiossarcoma, sarcoma indiferenciado, fibroma, fibrossarcoma, osteossarcoma, lipossarcoma, mixossarcoma, condrossarcoma, rabdomiossarcoma e histiocitoma maligno. O acometimento esplênico por disseminação metastática de neoplasia não hematogena é pouco comum nos cães (PRYMAK et al., 1988; SPANGLER; CULBERTSON, 1992).

O hemangioma é um tumor benigno de origem endotelial vascular, que pode localizar-se no baço, além de pele, fígado, rins, ossos e coração. Apresenta-se como nódulo único ou múltiplo, de coloração avermelhada e contornos irregulares. Macroscopicamente, sua distinção com o hemangiossarcoma não é possível, sendo indispensável a realização de análise histopatológica após a esplenectomia. Embora de comportamento biológico benigno, o hemangioma pode levar a anemia severa quando associado à ruptura esplênica e hemorragia (LIPTAK; FORREST, 2007).

A **esplenomegalia generalizada** (ou difusa) refere-se ao aumento de todo o órgão, e pode ser classificado em quatro tipos, baseado no mecanismo patológico envolvido: inflamação-infecção, hiperplasia linfocitária, congestão ou infiltração (NEER, 1996).

A esplenomegalia inflamatória resulta do efeito de um agente infeccioso, que pode atingir o órgão por disseminação hematogena, feridas penetrantes abdominais, migração de corpo estranho ou secundário à torção esplênica. É causada ainda por desordens infecciosas subagudas ou crônicas como erlichiose, brucelose, hemobartonelose ou micoses sistêmicas. A hiperplasia linfocitária refere-se ao aumento da função do sistema mononuclear fagocitário e dos componentes linfóides, sendo observado nas doenças bacterêmicas crônicas (como discospondilite e brucelose), no lúpus eritematoso e nas desordens hemolíticas (DAY et al., 1995; NEER, 1996).

Esplenomegalia congestiva ocorre quando a circulação venosa do baço é comprometida, como por exemplo, nos casos de insuficiência cardíaca congestiva direita, na hipertensão portal e na torção esplênica (NEER, 1996).

A esplenomegalia infiltrativa pode ser observada nos casos de hematopoiese extramedular, na amiloidose e na síndrome hipereosinofílica. A infiltração neoplásica constitui uma das mais freqüentes causas de esplenomegalia generalizada, sendo bastante observada nos pacientes com leucemia aguda ou crônica, mastocitose sistêmica, linfoma, mieloma múltiplo e histiocitose maligna (JOHNSON et al., 1989; FRY et al., 2003).

Os sintomas de alterações esplênicas, sejam elas focais ou generalizadas, são inespecíficos e podem incluir anorexia, perda de peso, aumento de volume abdominal, vômito, poliúria e polidipsia. O exame físico pode demonstrar palidez das mucosas, petéquias, equimoses e aumento palpável do órgão (NEER, 1996).

Taquiarritmias ventriculares são observadas com freqüência em cães com massas esplênicas, particularmente quando há ruptura do órgão, e as razões relacionadas são: hipóxia tecidual associada à anemia ou hipovolemia, metástases em miocárdio e liberação local ou sistêmica de catecolaminas (KEYES et al., 1993).

Durante anestesia geral, outros fatores que podem desencadear arritmias cardíacas incluem doenças cardíacas pré-existentes, hipotermia, anestesia prolongada, acidose e alterações na pressão sanguínea. Drogas anestésicas como o halotano sabidamente sensibilizam o miocárdio à epinefrina, favorecendo o desencadeamento de arritmias (KNAPP et al. 1993).

A avaliação do paciente com alteração esplênica deve incluir: hematimetria completa, bioquímica sérica, ultrassonografia abdominal e radiografia torácica (NEER, 1996). A citologia de aspirado por agulha fina guiada por ultrassom é especialmente útil no diagnóstico das esplenomegalias generalizadas, como nas neoplasias hematopoiéticas e nos processos infecciosos (ESPADA; RUIZ, 1998). A laparotomia exploratória é indicada nos casos onde não é possível estabelecer o diagnóstico ou quando há sinais de hemorragia esplênica (NEER, 1996).

A esplenectomia é um procedimento cirúrgico relativamente simples, entretanto, alguma dificuldade pode ser encontrada quando o baço encontra-se aumentado de volume ou friável. Complicações pós-operatórias são raras, sendo hemorragia abdominal a mais comum. Técnica operatória inadequada ou ligadura dos vasos muito próxima ao pâncreas e estômago podem levar a pancreatite



isquêmica e necrose gástrica. A maior desvantagem da esplenectomia é a perda da função esplênica, como reserva sanguínea e defesa imunológica, levando a menor tolerância ao exercício, resposta inadequada à hipóxia e ao choque, e maior susceptibilidade ao parasitismo eritrocitário (JOHNSON et al. 1989).

### 2.3 ANGIOGÊNESE TUMORAL

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, desencadeada por inúmeros fatores pró e antiangiogênicos. Está presente tanto nos processos fisiológicos, na cicatrização de feridas, desenvolvimento folicular e embriogênese, quanto nos patológicos, como nas retinopatias proliferativas, artrite reumatóide, psoríase e câncer (CHUN; THAMM, 2007).

O endotélio vascular é uma estrutura dinâmica e suas células possuem funções de grande importância. Elas captam e modificam lipoproteínas durante o transporte na parede arterial, regulam a permeabilidade vascular através das junções intercelulares, liberam substâncias pró-trombóticas, como fator de von Willebrand e fator tecidual, reagem à hipóxia tecidual produzindo fatores de crescimento como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e expressando receptores tirosina-quinase, entre outras funções (MINCHENKO et al., 1994; CHUN; THAMM, 2007).

Diversos fatores têm sido apontados como potenciais reguladores da angiogênese: fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), fator transformador de crescimento- alfa (TGF- alfa), fator de crescimento de hepatócito, fator de necrose tumoral (TNF- alfa), angiogina, interleucina 8 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (CHUN; THAMM, 2007).

Nas condições neoplásicas, os fatores pró-angiogênicos superam os antiangiogênicos, dando início a angiogênese tumoral. Sem o recrutamento de sua própria rede vascular, o crescimento tumoral não avançaria mais do que 2 mm em diâmetro, tamanho clinicamente insignificante na maioria das circunstâncias. Do mesmo modo, apenas com o aporte sanguíneo adequado e o desenvolvimento de novos vasos as células tumorais deixariam o tumor primário e ganhariam a circulação, dando origem às metástases (CHUN; THAMM, 2007).

A contagem de microvasos intratumorais foi introduzida por Weidner (1991) que marcou células endoteliais de carcinoma mamário em humanos. Este autor verificou aumento na incidência de metástases nos casos com maior número de microvasos por campo, nas áreas de maior vascularização. Verificou também correlação entre a densidade de microvasos nos cortes histológicos do carcinoma mamário inicial e a incidência de metástases e sobrevida.

Outros estudos em diferentes tumores também apontam que o número e a densidade de vasos estão diretamente relacionados com o grau de invasividade e metástase, incluindo os carcinomas prostáticos e mamários, melanomas cutâneos e os tumores de células germinativas testiculares (WEIDNER, 1995). Embora nem todos os tumores angiogênicos produzam metástases, sabe-se que a inibição da angiogênese previne o crescimento das células tumorais em seus sítios primários e secundários (WEIDNER et al., 1991).

O mesmo pode ser observado por Preziosi, Sarli e Paltrinieri (2004) nos mastocitomas cutâneos caninos, onde o grau de angiogênese correlacionou-se com o grau de mitose e invasão tecidual. Em tal estudo, a densidade de vasos intratumorais foi avaliada por imunohistoquímica através da marcação do fator endotelial VIII (fator de Von Willebrand). Os resultados mostraram diferença significativa entre os mastocitomas de graus I e III, podendo servir como fator prognóstico do comportamento tumoral.

#### 2.4 FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)

Diversas proteínas são apontadas como ativadoras do crescimento das células endoteliais, sendo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) um dos mais potentes envolvidos na angiogênese (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 2005).

Trata-se de uma glicoproteína sintetizada por células endoteliais, macrófagos, plaquetas, linfócitos, neutrófilos, osteoblastos, além de células tumorais (RESTUCCI et al., 2002; DAVIS-SMYTH, 2005).

VEGF promove proliferação e crescimento das células endoteliais a partir do estímulo de hipóxia, mediadores inflamatórios ou neoplasias. Tal glicoproteína estimula a enzima óxido nítrico sintetase no endotélio, resultando na produção de

óxido nítrico e na ativação da cascata angiogênica (MINCHENKO et al., 1994; PLATT et al., 2006).

Atua especificamente em seus sítios alvo, presentes nas células endoteliais, de modo autócrino e parácrino, causando a proliferação das células endoteliais e a angiogênese. Age ainda nas células inflamatórias, de maneira autócrina, promovendo a migração (HOUCK et al., 1992).

VEGF também é conhecido como fator de permeabilidade vascular baseado em sua habilidade de induzir a produção de proteases endoteliais, necessárias à degradação e fenestração da membrana basal. Este efeito resulta na formação de fibrina extravascular, rico substrato para o crescimento de células endoteliais e tumorais. Age ainda como vasodilatador, sendo 50.000 vezes mais potente que a histamina no aumento da permeabilidade vascular (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 2005; PLATT et al., 2006).

Além de ser um potente mitógeno de células endoteliais, o VEGF aumenta a expressão celular de metaloproteinases, degradando a matriz extracelular e facilitando a penetração dos neovasos no tecido, ao mesmo tempo em que diminui a expressão endotelial dos inibidores de metaloproteinases (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 2005).

Em 1996, Gabrilovich et al. observaram que o VEGF pode inibir a maturação de células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, o que facilitaria o crescimento tumoral evitando a indução de resposta imune por parte do hospedeiro.

Diversos estudos realizados em humanos com tumores de cérebro, pulmões, tireóide, mamas, tratos gastrointestinal e urinário apontam valores plasmáticos de VEGF significativamente maiores do que nos indivíduos saudáveis (SOH et al., 1996; WARREN et al., 1996; BORGSTROM et al., 1998; FERRARA; DAVIS-SMYTH, 2005).

Clifford et al. (2001) encontraram resultados semelhantes em cães com hemangiossarcoma. No estudo, a concentração plasmática de VEGF foi maior nos animais com a neoplasia do que nos animais saudáveis, embora não tenha sido possível correlacionar tal concentração com o estágio da doença.

Restucci et al. (2002) estudaram neoplasias mamárias em cães, marcando através da imunohistoquímica o VEGF tecidual, e puderam concluir que a expressão do fator de crescimento vascular endotelial correlacionou-se de modo significativo

com a densidade de vasos intratumorais, e que ambos eram maiores em neoplasias malignas pouco diferenciadas. Tal estudo demonstrou que a angiogênese e a malignidade estão amplamente associadas.

VEGF e seu receptor VEGFR-2 foram detectados nos fibrossarcomas cutâneos caninos, de maneira correlacionada, sugerindo atividade autócrina do fator de crescimento endotelial vascular sobre este tumor (AL-DISSI et al. 2009).

Os mesmos achados foram obtidos em estudo com meningiomas intracranianos em dezessete cães, que relacionou maior expressão de VEGF tecidual com menor sobrevida do paciente (PLATT et al., 2006).

Millanta et al. (2010) compararam a expressão de VEGF nos carcinomas mamários inflamatórios e não inflamatórios e concluíram que a imunoreatividade foi maior nos primeiros, sugerindo associação com a maior invasividade local e metástases sistêmicas observadas neste tipo tumoral.

Sendo assim, a determinação dos níveis séricos ou da expressão tecidual de VEGF pode servir como marcador tumoral em diversas malignidades, permitindo a avaliação da resposta à terapia e o estabelecimento do prognóstico. A terapia antiangiogênica pode ainda complementar as demais modalidades terapêuticas contra o câncer (FERRARA; DAVIS- SMYTH, 2005; PLATT et al., 2006).

#### 2.4.1 Gene do VEGF

Seis tipos de proteínas compõem a família VEGF: VEGF-A (a mais comum, e por isso chamada simplesmente de VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (fator viral) e Fator de crescimento placentário (PGF). Embora atuem de maneira semelhante, diferem na habilidade de se ligar à heparina e à matriz extracelular, e possuem receptores distintos (HICKLIN; ELLIS, 2005).

Localizado no cromossomo 6p 21.3, o gene do VEGF humano está organizado em 8 exons e seu peso molecular é de 45.000 daltons (FERRARA; DAVIS, 2005).

A análise do DNA de diferentes clones de VEGF humano indica que o VEGF pode existir em várias isoformas, na dependência do número e posição dos exons de sua estrutura. Tal variação determina o número de aminoácidos (121, 145, 165, 189 e 206 aminoácidos, respectivamente chamados de VEGF 121, VEGF 145,

VEGF 165, VEGF 189 e VEGF 206) e a atividade biológica da molécula (FERRARA; DAVIS, 2005).

VEGF 165 não recebe o exon 6, enquanto que o VEGF 121 não recebe os exons 6 e 7. Comparado com o VEGF 165, VEGF 121 tem 44 aminoácidos a menos, enquanto que o VEGF 206 tem inserção de 17 aminoácidos em sua cadeia (FERRARA; DAVIS, 2005). Tamanha diversidade na estrutura molecular sugere diferentes papéis para estas variantes (HOUCK et al., 1992).

No cão, pelo menos quatro isoformas de VEGF foram identificadas: VEGF 120, 164, 182 e 188, sendo o VEGF 164 a predominante. Comparados ao VEGF humano, a seqüência de aminoácidos destas isoformas exibe menos de 5% de trocas de resíduos, o que faz com que suas moléculas sejam muito parecidas. O VEGF canino ainda apresenta propriedades de ligação às células humanas com as mesmas respostas, tanto nas condições fisiológicas quanto patológicas, tornando-o estrutural e funcionalmente semelhante ao VEGF humano (SCHEIDEGGER et al., 1999).

#### 2.4.2 Receptores

A atividade do VEGF é mediada pela ligação em três tipos de receptores de transmembrana do tipo tirosina quinase, sendo eles: VEGFR-1 e VEGFR-2, associados à angiogênese, e o VEGFR-3, associado à linfangiogênese (FERRARA, 1999).

A localização destes receptores é diferente, estando o VEGFR-2 presente em quase toda célula endotelial, enquanto VEGFR-1 e VEGFR-3, apenas em alguns leitos vasculares (HICKLIN; ELLIS, 2005). (Quadro 1).

VEGFR-2, também chamado de KDR (kinase domain region) ou Flk-1 (fetal liver kinase), é o principal receptor do VEGF e VEGF-E, e media funções como permeabilidade vascular, proliferação, migração e invasão de célula endotelial (HICKLIN; ELLIS, 2005).

Alguns autores identificaram ainda outro receptor chamado de NEUROFILIN (NRP-1), também expresso no endotélio vascular, cuja função seria potencializar a ligação do VEGF165 com o VEGFR-2 e aumentar a quimiotaxia promovida por este

clone do fator de crescimento endotelial (SOKER et al., 1998).

VEGFR-1, também chamado de Flt-1 (fms-like tyrosine kinase 1), é o receptor do VEGF, VEGF-B e do fator de crescimento placentário. É o receptor mais importante na angiogênese embrionária, mas não parece ser indispensável à angiogênese tumoral (HICKLIN; ELLIS, 2005). Estudos sugerem que VEGFR-1 atua como regulador do VEGFR-2 de maneira negativa, indisponibilizando parte do VEGF para o segundo receptor (FERRARA, 1999)

VEGF-C e VEGF-D ligam-se preferencialmente ao receptor VEGFR-3 (Flt-4) encontrado somente nos vasos linfáticos de adultos, promovendo linfangiogênese e podendo estar relacionado ao desenvolvimento de metástases em linfonodos. Há evidências de que VEGFR-3 atua na manutenção da integridade vascular através da modulação da atividade do VEGFR-2 (HICKLIN; ELLIS, 2005).

| <b>Membros da família VEGF</b>                | <b>Receptores</b>               | <b>Função</b>             |
|---|---------------------------------|---------------------------|
| <b>VEGF (VEGF-A)</b>                          | VEGFR-1, VEGFR-2 e NEUROFILIN-1 | Manutenção da angiogênese |
| <b>VEGF-B</b>                                 | VEGFR-1                         | Não estabelecida          |
| <b>VEGF-C</b>                                 | VEGFR-2 e VEGFR-3               | Linfangiogênese           |
| <b>VEGF-D</b>                                 | VEGFR-2 e VEGFR-3               | Linfangiogênese           |
| <b>VEGF-E (Fator viral)</b>                   | VEGFR-2                         | Angiogênese               |
| <b>Fator de Crescimento placentário (PIG)</b> | VEGFR-1 e NEUROFILIN-1          | Angiogênese e inflamação  |

Quadro 1 - VEGF e seus receptores

Fonte: Hicklin; Ellis, 2005.

### 3 OBJETIVOS

1. Rever a prevalência das diversas desordens esplênicas através de análise retrospectiva do diagnóstico histopatológico;

2. Confrontar o diagnóstico histopatológico com as seguintes informações constantes nos prontuários: exames laboratoriais (hematócrito, contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas, proteína total e albumina séricas), principais manifestações clínicas, presença de arritmias cardíacas e hemoperitônio, na tentativa de se estabelecer, quando possível, o diagnóstico diferencial da esplenomegalia;

3. Avaliar se os espécimes obtidos dos animais portadores de neoplasia esplênica maligna (hemangiossarcoma) e benigna (hemangioma) expressam VEGF;

4. Comparar a expressão de VEGF tecidual nos hemangiossarcoma e hemangioma esplênicos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em outubro de 2008 e setembro de 2009, com os números de protocolos 1488/2008 e 1715/2009.

### **4.1 ESTUDO RETROSPECTIVO**

Foram incluídos no estudo retrospectivo 109 cães de ambos os sexos, de diversas raças e idades, atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, entre os anos de 2002 e 2009, submetidos à esplenectomia, cujo diagnóstico histopatológico pós-operatório encontrasse-se disponível.

Dos prontuários foram extraídas informações concernentes ao sexo, idade, raça, peso, manifestações clínicas, exames laboratoriais prévios à esplenectomia (valor de hematócrito, contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas, nível de proteína total e albumina séricas), alteração no traçado do eletrocardiograma e presença de hemoperitônio no momento do diagnóstico.

Os animais foram avaliados retrospectivamente e comparados entre si.

Foram excluídos da pesquisa 272 pacientes, que não foram submetidos à esplenectomia, cujos dados contidos em seus prontuários encontraram-se incompletos, que apresentaram outra patologia concomitante à esplenomegalia, incluindo metástases pulmonares ou abdominais, e/ou aqueles submetidos à esplenectomia por torção ou ruptura traumática do órgão.

### **4.2 ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO**

Para o estudo imunohistoquímico, foram selecionados os tecidos neoplásicos



fixados em parafina, adquiridos dos animais portadores de neoplasia maligna (hemangiossarcoma) e benigna (hemangioma).

A determinação da expressão tecidual de VEGF foi realizada a partir dos blocos parafinados previamente utilizados no diagnóstico histopatológico da afecção esplênica, armazenados no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Para controle positivo de expressão de VEGF foi utilizado tecido de granulação cutâneo canino.

As seções em lâminas silanizadas foram desparafinizadas em xilol (2 x de 15 minutos em estufa à 60° C) e reidratadas em uma série de etanol com concentrações decrescentes (100%, 95%, 70%), água destilada e PBS (5 minutos cada).

O desmascaramento foi feito com tampão EDTA, durante 20 minutos em microondas, em potência máxima. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio diluído em metanol, durante 30 minutos, no escuro e em temperatura ambiente.

Depois de lavagens em PBS, as reações inespecíficas foram bloqueadas com solução de leite desnatado a 5%, diluído em água destilada, durante 15 minutos em estufa à 36°C. Na sequência, as seções foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-VEGF humano, clone VG1 (DAKO® - código M7273), na diluição de 1:30, por 15 horas, em câmara úmida, a 4° C. Para controle negativo, omitiu-se o anticorpo primário, substituindo-o por PBS.

Depois da lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com Anticorpo Secundário Biotinilado (DAKO®) por 30 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas com o complexo Estreptavidina-Biotina por 30 minutos em temperatura ambiente. A revelação foi realizada com 3-amino-9-ethylcarbazole (DAKO® - código K3461).

As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina, lavadas em água destilada e montadas com lamínula em meio aquoso (DAKO® - código S3025).

As lâminas foram visualizadas em Microscópio Nikon Eclipse (E-800) equipado com câmara de vídeo (Coll snap – Proc cf color®). As imagens foram capturadas e analisadas utilizando-se o software Image-Pro Plus.

A expressão de VEGF foi quantificada por meio da observação de células positivas e negativas para VEGF em 10 campos aleatórios, em objetiva de 20x contando-se no mínimo 2000 células.

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados, realizou-se estatística descritiva. As associações de interesse foram estudadas por meio do teste de qui-quadrado com correção de Yates. Para comparação das características clínicas e laboratoriais dos animais com afecções esplênicas benignas e neoplasias malignas utilizou-se o teste *t student* depois de verificados e atendidos os pressupostos de normalidade e independência. A homocedasticidade dos dados de cada grupo foi verificada pelo teste F; quando do não atendimento utilizou-se o teste *t student* presumindo variâncias diferentes. Para tomada de decisão adotou-se o nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 2002 a dezembro de 2009 foram atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais 29.592 casos novos, sendo que destes, 381 cães (1%) eram portadores de esplenomegalias.

Dos cães submetidos à esplenectomia, cento e nove foram selecionados para este estudo retrospectivo, por apresentarem todos os dados completos em seus prontuários (tabela 10).

### 5.1. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

O diagnóstico histopatológico revelou que **52%** (57 animais) das formações esplênicas eram não neoplásicas, caracterizadas por hematoma (n=23, 40%), hiperplasia nodular (n=23; 40%), esplenite (n=6; 11%), abscesso (n=4; 7%) e infarto (n=1; 2%), enquanto que **48%** (52 animais) eram neoplásicas, caracterizadas por hemangiossarcoma (n=28; 54%), hemangioma (n=10; 19%), fibrohistiocitoma maligno (n=3; 6%), linfoma (n=3; 6%), leiomiossarcoma (n=2; 4%), lipossarcoma (n=2; 4%), carcinoma (n=1; 2%), plasmocitoma (n=1; 2%), sarcoma (n=1; 2%) e tvf (n=1; 2%).

Classificando por esplenomegalias benignas ou malignas, levando-se em consideração o prognóstico provável da afecção, observou-se que **61%** eram benignas, caracterizadas por hematoma (n=23; 21%), hiperplasia nodular (n=23; 21%), hemangioma (n=10; 9%), esplenite (n=6; 5%), abscesso (n=4; 3%) e infarto esplênico (n=1; 1%). Dentre as esplenomegalias malignas (**39%**), o hemangiossarcoma foi o mais freqüente, acometendo 28 animais (25%), seguido de fibrohistiocitoma maligno (n=3; 3%), linfoma (n=3; 3%), leiomiossarcoma (n=2; 2%), lipossarcoma (n=2; 2%), plasmocitoma (n=1; 1%), sarcoma pouco diferenciado (n=1; 1%) e tumor venéreo transmissível (n=1; 1%). Quando analisado dentro do grupo de neoplasias malignas, o hemangiossarcoma representou quase 70% dos diagnósticos (gráfico 1).

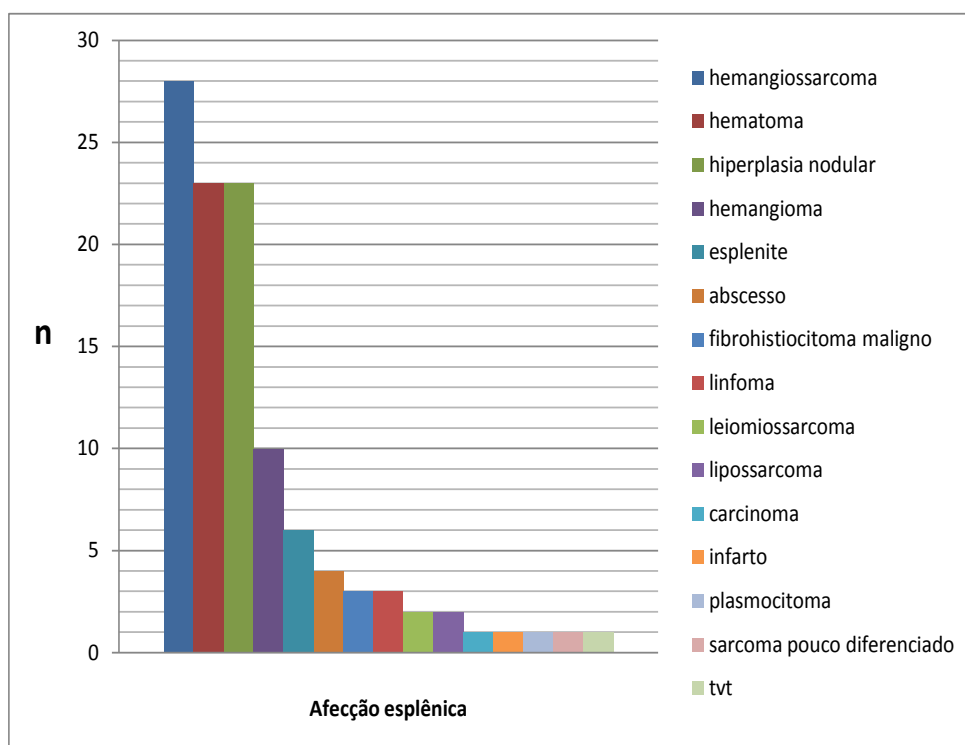


Gráfico 1 - Prevalência das esplenomegalias, nos animais submetidos à esplenectomia – São Paulo - 2002-2009

## 5.2 IDADE

No geral, a média de idade foi de 10 anos ( $\pm 3$ ), variando de 2 a 16 anos. A mesma média obteve o grupo de animais com neoplasias enquanto que nas afecções não neoplásicas a média foi de 9 anos ( $\pm 3$ ) (gráfico 2).

Dentre os animais com neoplasias, não houve diferença de idade entre as malignas e benignas (média de 10 anos  $\pm 2$ ). A idade dos pacientes com hemangiossarcoma variou de 8 a 14 anos (com média de 10 anos  $\pm 2$ ).

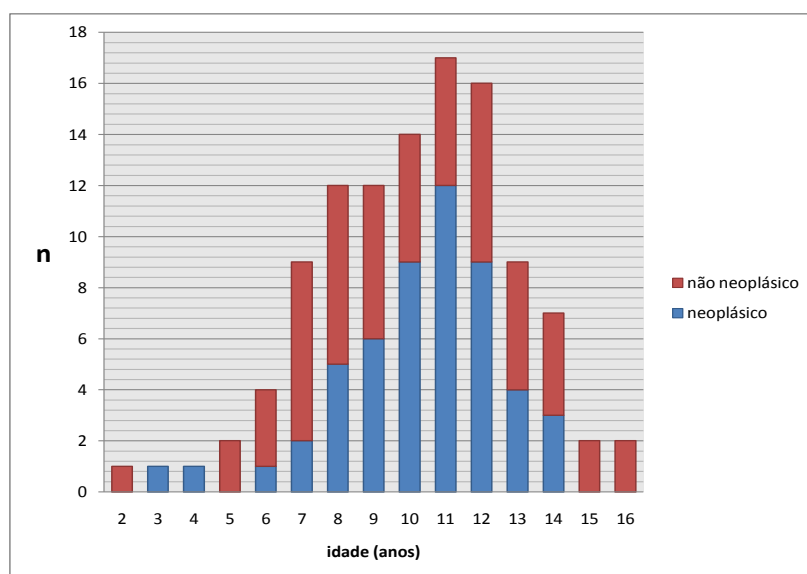


Gráfico 2 – Distribuição das afecções esplênicas segundo faixa etária – São Paulo - 2002-2009

### 5.3 RAÇAS

De modo geral, vinte raças foram representadas no estudo, sendo mais freqüentes os sem raça definida (n=30; 28%), seguidas pelo Pastor Alemão (n=19; 17%), Poodle (n=16; 15%) e Rottweiler (n=6; 6%).

Esta mesma distribuição foi observada dentre o grupo de cães com esplenomegalias benignas. Já nas malignas, a raça mais prevalente foi o Pastor Alemão, com 10 animais (24%), seguido pelo SRD (n=9; 21%) e Poodle (n=8; 19%) (gráfico 3).

Quando classificados por doença neoplásica e não neoplásica, a distribuição foi semelhante aos grupos de esplenomegalias malignas e benignas, respectivamente.

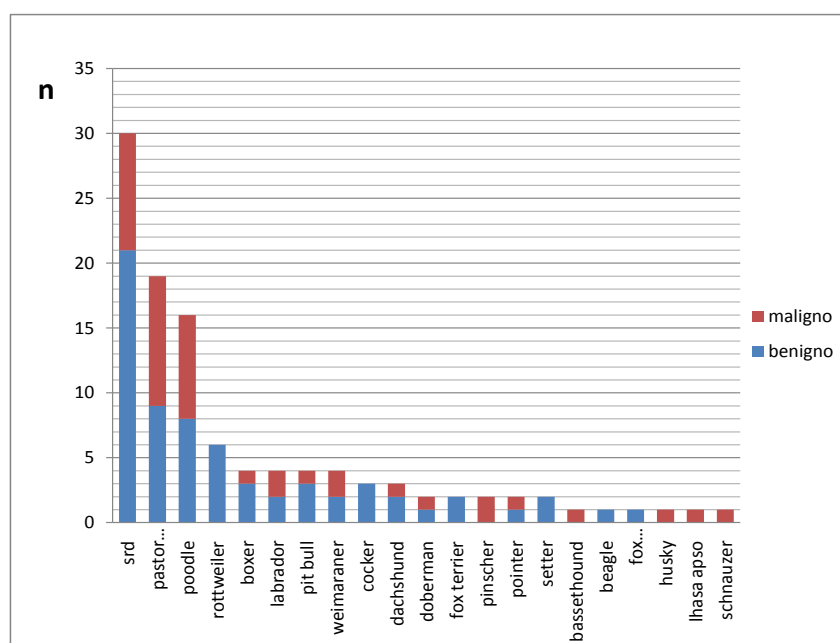


Gráfico 3 - Distribuição das raças segundo afecção esplênica – São Paulo - 2002-2009

## 5.4 PESO

O peso dos animais variou de 3 a 58 kg, com média de 22 kg ( $\pm 13$ ), semelhante entre os grupos com afecções neoplásicas e não neoplásicas, ou dentre as esplenomegalias benignas e neoplasias malignas (tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos cães segundo peso - São Paulo - 2002-2009

|                                    | <15 kg (%) | 15-30kg (%) | >30kg (%) |
|------------------------------------|------------|-------------|-----------|
| <b>Esplenomegalia benigna (67)</b> | 25 (23)    | 19 (17)     | 23 (21)   |
| <b>Neoplasia maligna (42)</b>      | 15 (14)    | 14 (13)     | 13 (12)   |

## 5.5 SEXO

A população geral consistiu de 60 fêmeas e 49 machos, representando 55% e 45% respectivamente. Dentre o grupo de animais com afecções neoplásicas, houve 29 fêmeas (55%) e 23 machos (45%). Já dentre as afecções não neoplásicas, houve 31 fêmeas (55%) e 26 machos (45%).

Distribuição semelhante foi observada entre os grupos com esplenomegalias benignas e neoplasias malignas (tabela 2).

Não foi possível precisar a quantidade de animais inteiros ou castrados.

Tabela 2 - Distribuição dos cães segundo sexo e afecção esplênica - São Paulo - 2002-2009

| Sexo         | Esplenomegalia benigna | Neoplasia maligna | Total | $\chi^2$ | p     |
|--------------|------------------------|-------------------|-------|----------|-------|
| Feminino     | 38                     | 22                | 60    |          |       |
| Masculino    | 29                     | 20                | 49    |          |       |
| <b>Total</b> | 67                     | 42                | 109   | 0,060    | 0,806 |

## 5.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

De modo geral, as manifestações clínicas no momento do diagnóstico variaram, sendo as mais freqüentes disorexia, presente em 48% dos cães, apatia em 22%, emese em 18% e distensão abdominal em 17% dos animais (tabela 3).

Dezessete animais não apresentavam qualquer sintoma, sendo a esplenomegalia um achado durante o exame clínico. Dentre estes, a maioria era acometida por tumoração benigna do órgão (n=13; 76%).

Classificando por afecções neoplásicas e não neoplásicas, os sintomas foram bastante semelhantes, sendo os mais evidentes nas afecções neoplásicas a disorexia (n=22; 42%), apatia (n=15; 29%) e distensão abdominal (n= 9; 17%) e nas não neoplásicas, disorexia (n=19; 33%), emese (n=11; 19%) e distensão abdominal (n=10; 17%).

Dentre o grupo de cães com esplenomegalias benignas, emese foi evidente em 22% dos pacientes enquanto que nas malignas, este sintoma esteve presente em apenas 12% dos cães.

Tabela 3 – Distribuição das principais manifestações clínicas e suas freqüências nos 109 cães acometidos por esplenomegalia – São Paulo - 2002-2009

| <b>Manifestações clínicas</b> | <b>n</b> | <b>%</b> |
|-------------------------------|----------|----------|
| disorexia                     | 52       | 48       |
| apatia                        | 24       | 22       |
| emese                         | 20       | 18       |
| distensão abdominal           | 19       | 17       |
| NDN *                         | 17       | 16       |
| dor abdominal                 | 12       | 11       |
| emagrecimento                 | 9        | 8        |
| diarréia                      | 7        | 6        |
| polidipsia                    | 5        | 5        |
| dificuldade deambulatória     | 2        | 2        |
| aquesia                       | 1        | 1        |
| colúria                       | 1        | 1        |
| febre                         | 1        | 1        |
| síncope                       | 1        | 1        |

\*nada digno de nota



## 5.7 PRESENÇA DE HEMOPERITÔNIO

No momento do diagnóstico ultrassonográfico da afecção esplênica, avaliou-se a presença de líquido livre abdominal, confirmada posteriormente no ato operatório como derrame hemorrágico secundário à ruptura esplênica.

Dos 109 animais, 16 (15%) apresentaram hemoperitônio, sendo onze em casos de afecções malignas (11 hemangiossarcomas; 69%) e cinco em afecções benignas (3 hematomas (19%), 1 hemangioma (6%) e 1 hiperplasia nodular (6%))

A análise estatística revelou associação significativa entre a presença de hemoperitônio e o tipo de afecção esplênica ( $p < 0,05$ ) (tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos cães segundo ausência e presença de hemoperitônio e esplenomegalia - São Paulo - 2002-2009

| Hemoperitônio | Esplenomegalia benigna | Neoplasia Maligna | Total | $\chi^2$ | p              |
|---------------|------------------------|-------------------|-------|----------|----------------|
| Ausente       | 62                     | 31                | 93    |          |                |
| Presente      | 5                      | 11                | 16    |          |                |
| Total         | 67                     | 42                | 109   | 5,812    | <b>0,0159*</b> |

\* diferença estatística significativa para  $\alpha = 0,05$

## 5.8 ELETROCARDIOGRAMA

Parte dos animais incluídos neste estudo realizou eletrocardiograma previamente à esplenectomia. Destes 65 cães, 13 (20%) apresentaram alterações no traçado eletrocardiográfico, caracterizadas por contração ventricular prematura (n=7; 54%), taquicardia ventricular (n=3; 23%), parada sinusal (n=2; 15%) e alteração da repolarização ventricular (n=1; 8%) (tabela 5).

Tabela 5 – Alterações no traçado do eletrocardiograma nos animais com esplenomegalia - São Paulo - 2002-2009

| Achado eletrocardiográfico             | n  | %  |
|--|----|----|
| Contração ventricular prematura        | 7  | 11 |
| Taquicardia ventricular                | 3  | 5  |
| Parada sinusal                         | 2  | 3  |
| Alteração na repolarização ventricular | 1  | 2  |
| Sem alterações                         | 52 | 80 |

Quando comparados em grupos, não houve diferença estatística na incidência de arritmias nos animais com afecções neoplásicas e não neoplásicas ou entre esplenomegalias malignas e benignas (tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição dos cães, segundo presença ou ausência de alteração no traçado eletrocardiográfico e afecção esplênica - São Paulo - 2002-2009

| Arritmia | Esplenomegalia benigna | Neoplasia Maligna | Total | $\chi^2$ | p      |
|----------|------------------------|-------------------|-------|----------|--------|
| Ausente  | 30                     | 22                | 52    |          |        |
| Presente | 8                      | 5                 | 13    |          |        |
| Total    | 38                     | 27                | 65    | 0,004    | 0,9498 |

## 5.9 EXAMES LABORATORIAIS

Para avaliação dos níveis de hematócrito, leucócitos, plaquetas, proteína total e albumina foram utilizados os exames laboratoriais coletados no período mais próximo à esplenectomia, no momento do diagnóstico ou no pré-operatório imediato (tabela 11).

O nível do hematócrito variou de 13 a 56% (média de 33%,  $\pm 10$ ). Quando comparados em grupos, os animais acometidos por esplenomegalias benignas apresentaram média de hematócrito de 35% ( $\pm 10$ ), enquanto que nas neoplasias malignas, a média foi menor, de 29% ( $\pm 8$ ). (tabela 7)

De maneira semelhante, a contagem absoluta de hemácias revelou-se diminuída na maioria dos animais, com média de 5,0 milhões de hemácias por  $\text{mm}^3$  ( $\pm 2$ ). Quando avaliados em grupos, os animais com neoplasia maligna obtiveram média de contagem eritrocitária menor que os cães com esplenomegalia benigna (4,5 milhões por  $\text{mm}^3$  e 5,3 milhões por  $\text{mm}^3$ , respectivamente).

A leucometria variou de 1.900 a 135.600 leucócitos por  $\text{mm}^3$ , com média de 22.375 ( $\pm 20.897$ ). Nas neoplasias malignas a contagem média foi de 24.143, enquanto nas esplenomegalias benignas, foi de 21.266 leucócitos por  $\text{mm}^3$ .

A contagem de plaquetas variou de 37.000 a 1.220.000, com média de 289.010 ( $\pm 206.000$ ), valor semelhante tanto nos animais acometidos por neoplasias malignas quanto nas esplenomegalias benignas.

Parte dos animais realizou dosagem da proteína total sérica, obtendo valores que variaram de 4,6 a 12 g/dl, numa média de 7 g/dl ( $\pm 1$ ). A média foi semelhante entre os grupos de animais acometidos por afecções benignas e neoplasia maligna.

A dosagem de albumina sérica variou de 1,6 a 4 g/dl, com média de 3g/dl ( $\pm 1$ ), valores semelhantes entre os grupos de animais com neoplasias malignas ou esplenomegalias benignas.

Tabela 7 - Comparação das características clínicas e laboratoriais dos animais com esplenomegalias benignas e neoplasias malignas - São Paulo - 2002-2009.

| Característica                                    | Esplenomegalia benigna |                         | Neoplasia maligna |                         | t      | p             |
|---|------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|--------|---------------|
|   | n                      | média±dp                | n                 | média±dp                |        |               |
| Idade (anos) <sup>a</sup>                         | 67                     | 10,01±2,99              | 42                | 10,36±2,24              | -0,681 | 0,497         |
| Peso (kg) <sup>b</sup>                            | 67                     | 22,79±13,02             | 42                | 21,59±13,22             | 0,464  | 0,644         |
| Hematócrito (%) <sup>b</sup>                      | 67                     | 35,30±10,36             | 42                | 29,81±8,43              | 2,884  | <b>0,005*</b> |
| Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>  | 67                     | 5,30±1,64               | 42                | 4,54±1,41               | 2,472  | <b>0,015*</b> |
| Leucócito (milhões/mm <sup>3</sup> ) <sup>b</sup> | 67                     | 21266,48±<br>19867,02   | 42                | 24143,38±<br>22577,49   | -0,698 | 0,487         |
| Plaqueta (milhões/mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>  | 67                     | 280820,89±<br>136516,28 | 42                | 287880,95±<br>247431,80 | -0,169 | 0,866         |
| Proteína total (g/dl) <sup>a</sup>                | 55                     | 6,96±1,27               | 36                | 6,79±0,93               | 0,717  | 0,475         |
| Albumina (g/dl) <sup>a</sup>                      | 51                     | 2,59±0,50               | 34                | 2,66±0,66               | -0,463 | 0,645         |

<sup>a</sup>teste t presumindo variâncias desiguais; <sup>b</sup> teste t presumindo variâncias iguais

\* diferença estatística significativa para  $\alpha=0,05$

## 5.10 IMUNOHISTOQUÍMICA – VEGF

As células neoplásicas endoteliais de todos hemangiossarcomas e hemangiomas expressaram fator de crescimento endotelial vascular, em diferentes graus (figura 1).

Nos animais com hemangiossarcoma, 21 das 23 amostras expressaram VEGF em mais de cinquenta por cento de suas células, enquanto que em 2 animais, menos de 50% das células foram positivas.

Já nos hemangiomas, 6 das 7 amostras analisadas expressaram VEGF em mais de 50% das suas células, sendo que apenas 1 amostra revelou menos que 50% de positividade (tabela 8).

Tabela 8 – Expressão de VEGF nos hemangiossarcomas e hemangiomas, de acordo com a porcentagem de células positivamente marcadas - São Paulo - 2002-2009

| CLASSIFICAÇÃO           | n  | % de células positivamente marcadas |         |          |          |
|-------------------------|----|-------------------------------------|---------|----------|----------|
|                         |    | 0   25                              | 25   50 | 50   75  | 75   100 |
| <b>Hemangiossarcoma</b> | 23 | -                                   | 2 (9%)  | 20 (87%) | 1 (4%)   |
| <b>Hemangioma</b>       | 7  | -                                   | 1 (14%) | 6 (86%)  | -        |

Assim como observado nos tecidos de granulação (figura 2), intensa imunoreatividade foi detectada nas células inflamatórias infiltradas, como linfócitos, neutrófilos e macrófagos em ambos tipos neoplásicos. Já os fibroblastos trabeculares apresentaram menor intensidade de marcação.

A quantificação da expressão de VEGF nos hemangiossarcomas e hemangiomas, assim como os valores laboratoriais dos referidos animais encontram-se discriminados nas tabelas 9 e 12.

Tabela 9 - Comparação das características clínicas e laboratoriais dos animais acometidos por hemangioma e hemangiossarcoma esplênicos sujeitos a imunohistoquímica. São Paulo - 2002-2009

|                                       | Hemangioma |                         | HSA |                         | t      | p             |
|---------------------------------------|------------|-------------------------|-----|-------------------------|--------|---------------|
|                                       | n          | media±dp                | n   | media±dp                |        |               |
| Total de células contadas             | 7          | 2433,86±34<br>0,44      | 23  | 2997,26±<br>939,69      | -1,54  | 0,135         |
| VEGF+ <sup>a</sup>                    | 7          | 1390,00±15<br>0,25      | 23  | 1847,43±<br>631,18      | -3,191 | <b>0,004*</b> |
| VEGF-                                 | 7          | 1043,86±28<br>5,14      | 23  | 1149,83±<br>436,56      | -0,6   | 0,553         |
| Hematócrito (%)                       | 7          | 38,29±5,28              | 23  | 27,35±8,64              | 3,151  | <b>0,004*</b> |
| Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )   | 7          | 5,73±0,85               | 23  | 4,12±1,48               | 2,716  | <b>0,011*</b> |
| Leucócitos (milhões/mm <sup>3</sup> ) | 7          | 13697,71±<br>6863,40    | 23  | 25221,30±<br>16705,48   | -1,763 | 0,089         |
| Plaquetas (milhões/mm <sup>3</sup> )  | 7          | 325857,14±<br>183908,88 | 23  | 208260,87±<br>183336,56 | 1,485  | 0,149         |
| Proteína total (g/dl)                 | 5          | 6,88±0,41               | 20  | 6,64±0,79               | 0,647  | 0,524         |
| Albumina (g/dl)                       | 5          | 3,00±0,47               | 19  | 2,85±0,64               | 0,478  | 0,637         |

<sup>a</sup>teste t presumindo variâncias desiguais

\* diferença estatística significativa para  $\alpha=0,05$

HSA= hemangiossarcoma

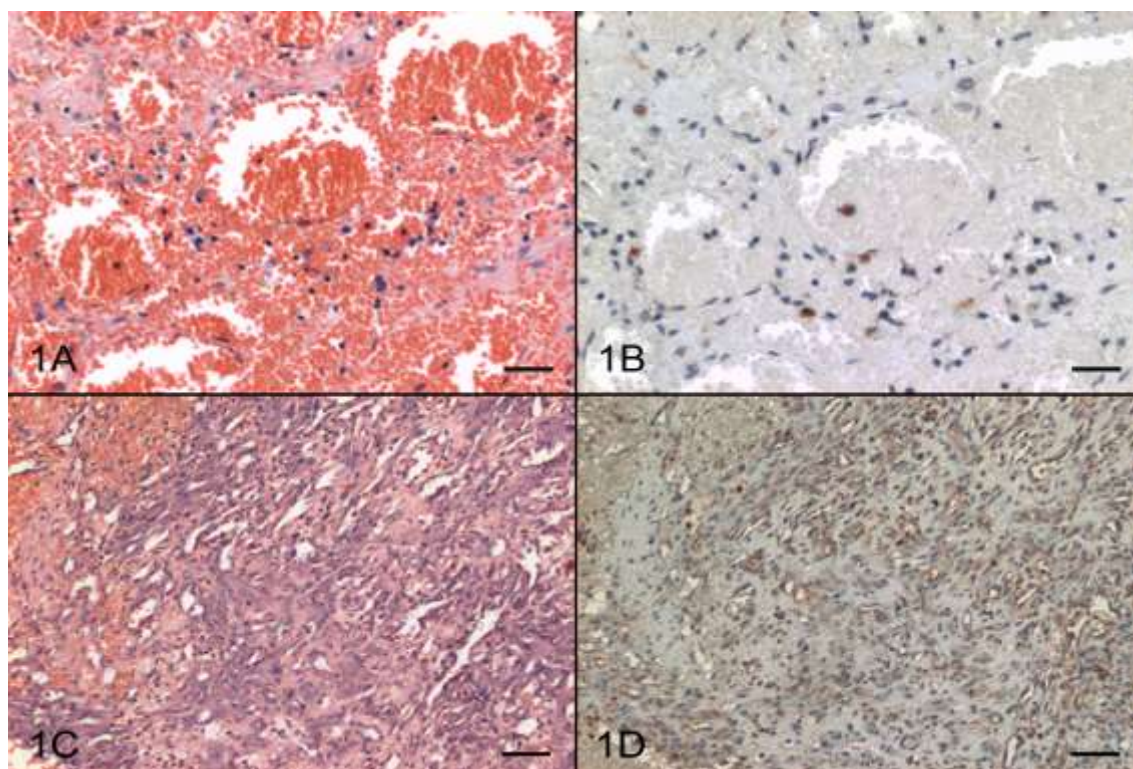


Foto: CAMPOS, A.G.

Figura 1 - Fotomicrografia de neoplasias esplênicas em cães: (1A) Hemangioma, mostrando grandes espaços vasculares circundados por camada de células endoteliais alinhadas entre os finos septos colagênicos. HE. Barra= 20 $\mu$ m. (1B) Hemangioma, revelando fraca marcação citoplasmática nas células inflamatórias. IHQ. Barra= 20 $\mu$ m. (1C) Hemangiossarcoma, mostrando células endoteliais neoplásicas agrupadas entre as trabéculas de colágeno, criando canais vasculares tortuosos e de diversos tamanhos. HE. Barra= 40 $\mu$ m. (1D) Hemangiossarcoma, revelando forte marcação citoplasmática de VEGF. IHQ. Barra= 40 $\mu$ m. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET – FMVZ/ USP – São Paulo – 2002 - 2009.

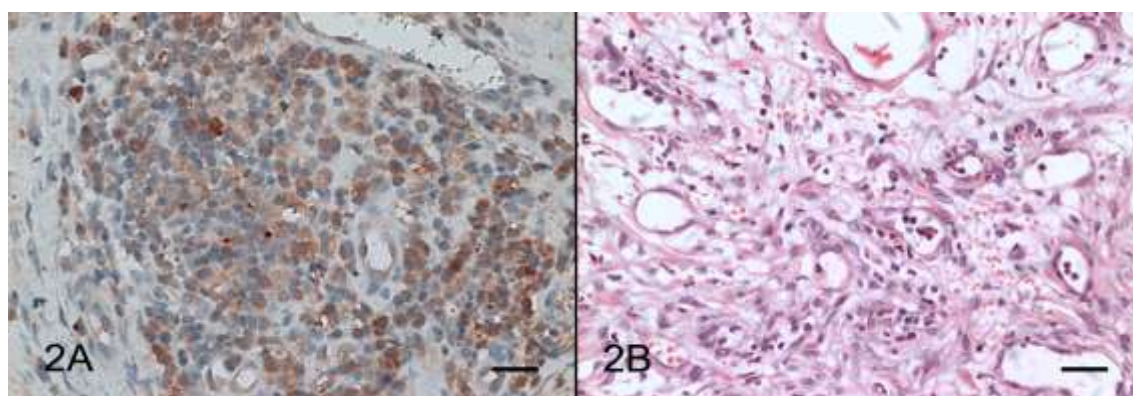


Foto: CAMPOS, A.G.

Figura 2 - Fotomicrografia de tecido de granulação cutâneo canino em cães: (2A) Marcação forte e difusa de VEGF nas células endoteliais e inflamatórias. IHQ. Barra= 20  $\mu$ m (2B). Fibroplasia e células endoteliais imaturas, ao redor de vasos sanguíneos recém formados. HE. Barra= 40  $\mu$ m. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET – FMVZ/ USP – São Paulo – 2002 - 2009.



## 6 DISCUSSÃO

Diversos autores descrevem a regra dos “dois terços”: dois terços dos animais com formações esplênicas teriam neoplasia, sendo que destes, dois terços teriam hemangiossarcoma. Johnson et al. (1989) fazem parte deste grupo, relatando que num estudo com 100 animais esplenectomizados, 66 apresentavam-se com neoplasia, sendo 43 hemangiossarcomas.

Frey e Betts (1977) observaram que 75% de 57 esplenectomias apontavam como principal diagnóstico doença neoplásica, embora neste estudo não houvesse distinção entre hemangiomas e hemangiossarcomas.

Em 1987, Hosgood descreveu que 52% das esplenectomias tiveram como diagnóstico neoplasia esplênica, apesar do autor ter incluído na pesquisa alguns animais sem resultado histopatológico.

De modo semelhante, Day et al. (1995) identificaram que o diagnóstico mais freqüente em 87 esplenectomias foi neoplasia, sendo 17 hemangiossarcomas.

Diferente do relato de muitos autores, observou-se no presente estudo que a maioria das afecções caracterizou-se por esplenomegalias não neoplásicas, como hematoma, hiperplasia nodular, esplenite, abscesso e infarto. Dos animais portadores de neoplasia, mais da metade caracterizava-se por hemangiossarcoma.

Entretanto, foram incluídos nesta pesquisa apenas os cães submetidos à esplenectomia, sendo excluídos aqueles com diagnóstico prévio de doenças sistêmicas, como mastocitoma, linfoma, anemia hemolítica imunomediada, erlichiose e torção secundária ao vólculo gástrico. Tais exclusões podem justificar a maior incidência de neoplasias em estudos que incluem o diagnóstico da esplenomegalia através da citologia por aspirado com agulha fina.

Alguns estudos sugerem que a idade dos animais submetidos à esplenectomia poderia refletir a afecção presente. Hosgood (1987), analisando 31 casos submetidos à esplenectomia, observou que a média de idade dos animais acometidos por neoplasia era maior que os demais (9,5 anos versus 7,7, anos).

Em 1989, Johnson et al. avaliaram 100 animais submetidos à esplenectomia e concluíram que as afecções esplênicas, com exceção da torção esplênica, afetaram principalmente animais idosos.

Em análise retrospectiva de 217 casos, Prymak et al. (1988) concluíram que



cães com 8 anos ou mais tem maior chance de apresentar hemangioma esplênico quando comparados aos animais mais jovens, enquanto que na idade de 8 a 13 anos os cães teriam maior probabilidade de apresentarem hemangiossarcoma esplênico.

No presente estudo, a diferença de idade dos animais acometidos por neoplasia não foi estatisticamente significativa quando comparado às afecções não neoplásicas. O mesmo observou-se ao comparar o grupo de cães com afecções benignas e neoplasias malignas. Assim como o relatado pela literatura, cães com hemangiossarcoma esplênico apresentaram-se mais idosos, com 8 a 14 anos.

No geral, os cães sem raça definida foram os mais acometidos por esplenomegalias, mas isto pode estar relacionado à alta prevalência de SRD na população onde foi realizado o estudo. Entre os anos de 2002 e 2009, cerca de 35% de todos os pacientes atendidos como casos novos no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais apresentavam miscigenação racial.

Ao incluir apenas as raças puras, o Pastor Alemão foi o mais freqüente, tanto nas afecções malignas quanto nas benignas, corroborando com os achados de Prymak et al. (1988) e Spangler e Culbertson (1992).

Em 1995, Day, Lucke e Pearson estudaram 87 resultados de histopatológicos esplênicos e observaram prevalência de Labradores em 19% dos casos. Embora este número pudesse sugerir maior predisposição racial, o próprio autor ressaltou que o estudo foi feito com amostras de diferentes locais, sem uma população controle definida.

Prevalência semelhante foi relatada por Hammond e Pesillo-Crosby (2008), onde 23 de 71 cães (32%) eram Labradores Retrievers, seguidos por Golden Retrievers (20%) e Pastores Alemães (10%). No presente estudo, os Retrievers representaram apenas 4% dos animais acometidos por afecções esplênicas.

Enquanto Johnson et al. (1989) afirmam que as doenças esplênicas são mais freqüentes nos animais de grande porte, observou-se neste estudo uma distribuição homogênea, com metade dos animais pesando mais de 21 quilos. Não houve diferença de peso estatisticamente significativa entre os animais com afecção neoplásica e não neoplásica, ou entre as afecções malignas ou benignas.

Em 1977, Frey e Betts sugeriram maior predileção dos machos ao hemangiossarcoma esplênico, embora seu estudo não incluísse um grupo controle.

Já Prymak et al. (1988) observaram, a partir de 217 casos, maior predileção

das fêmeas, principalmente as castradas, ao hemangiossarcoma, quando comparado ao grupo controle submetido a biópsias esplênicas. O hematoma foi mais freqüente nos machos, embora o resultado não fosse estatisticamente significativo.

Em 2008, Hammond e Pesillo-Crosby observaram que em 71 cães com massa esplênica e hemoperitônio, a distribuição entre machos e fêmeas era semelhante, e que 93% dos animais eram castrados. Dentre o grupo com hemangiossarcoma, a freqüência foi a seguinte: dos 50 cães, 27 eram machos (sendo 25 castrados e 2 inteiros) e 9 fêmeas (todas castradas).

Diferente do encontrado na literatura, a freqüência de fêmeas detectada neste estudo foi maior tanto nas afecções benignas quanto nas neoplasias malignas, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Não foi possível precisar se os animais eram inteiros ou castrados.

Assim como relatado pela literatura, as manifestações clínicas das doenças esplênicas foram bastante variáveis. De modo geral, disorexia foi o sintoma mais freqüente no momento do diagnóstico, presente em quase 50% dos cães. Em 1988, Prymak et al. sugeriram que tal sintoma fosse preditivo de hemangiossarcoma, o que não foi verificado no presente estudo, já que esteve presente, de modo equivalente, tanto nas esplenomegalias neoplásicas e não neoplásicas, ou benignas e malignas.

Os mesmo autores ressaltaram que a anorexia e a caquexia associadas ao câncer são as maiores causas de óbito em pacientes humanos. Uma síndrome similar é observada freqüentemente nos cães com tumores malignos e, quando considerados junto a outros achados clínicos, pode ajudar a diferenciar entre doença benigna ou maligna.

A compressão das demais vísceras abdominais pode ter resultado em dor abdominal, vômito e diarreia, outras manifestações aqui encontradas. Prymak et al. (1988) associaram estes sintomas com os hematomas esplênicos, o que poderia ser atribuído ao desenvolvimento insidioso de grandes massas antes de outros sintomas aparentes.

Diferente dos referidos autores, no presente estudo vômito e diarreia estiveram mais presente nos cães com afecções benignas, enquanto a dor abdominal foi mais evidente nos cães com neoplasias malignas.

A distensão abdominal foi observada em apenas 19 cães, sendo 11 com

afecções benignas e oito com neoplasias malignas. Não houve correlação da distensão abdominal com a ruptura do baço, visto que em apenas cinco cães com este sintoma o hemoperitônio estava presente.

Alterações esplênicas foram incidentais em 17 cães, sendo encontradas durante exames de rotina. Dezenove por cento dos cães com afecções benignas não apresentaram qualquer queixa clínica e 10% dos portadores de neoplasias malignas também não.

Diversos autores apontam como alta a prevalência de hemangiossarcoma nos animais portadores de massas esplênicas quando associadas ao hemoperitônio. Em 2008, Hammond e Pesillo-Crosby realizaram estudo em 71 cães anêmicos com massa esplênica rompida e concluíram que a prevalência de hemangiossarcoma foi de 70%.

Analisando 100 esplenomegalias, Johnson et al. (1989) notaram que a ruptura do baço, analisada isoladamente, teve alto valor preditivo para o diagnóstico de neoplasia: 95% dos cães com hemoperitônio apresentavam neoplasia esplênica.

Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, onde se observou hemoperitônio em 16 dos 109 cães (15%), sendo 11 em casos de neoplasia maligna (11 hemangiossarcomas) e 5 em afecções benignas (3 hematomas, 1 hiperplasia nodular e 1 hemangioma). A análise estatística revelou associação significativa entre a presença de hemoperitônio e neoplasia maligna, sendo a chance de um cão com ruptura esplênica ter neoplasia maligna 4,4 vezes maior do que a de um cão sem hemoperitônio.

Prymak et al. (1988) relataram que 39 de 51 cães (76%) com hemangiossarcoma apresentavam hemoperitônio, enquanto que 24 de 81 cães (29%) com hematoma esplênico apresentaram o mesmo achado clínico.

Aqui, a incidência de hemoperitônio foi menor que nos demais estudos, acometendo 11 de 28 cães (39%) com hemangiossarcoma e 3 de 23 cães (13%) com hematoma esplênico. Cabe lembrar que os cães com histórico de trauma foram excluídos da pesquisa, o que pode ter diminuído o número de pacientes portadores de massas esplênicas rompidas.

Arritmia cardíaca é um achado freqüente dentre os animais portadores de esplenomegalias. No presente estudo, o traçado eletrocardiográfico foi realizado previamente à esplenectomia em 65 animais, e detectou alteração em 13 casos (20%).

Dentre eles, oito (62%) ocorreram em animais com afecções esplênicas benignas, como hiperplasia nodular (4 cães – 31%), hematoma (3 cães – 23%) e hemangioma (1 cão – 8%). O restante acometeu animais com neoplasia maligna, como hemangiossarcoma (3 cães – 23%), leiomiossarcoma (1 cão - 8%) e plasmocitoma (1 cão – 8%).

Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, a partir de estudo prospectivo avaliando a prevalência de arritmias em 50 cães submetidos à esplenectomia, sendo que 38% dos animais apresentaram neoplasia enquanto que 62% apresentaram esplenomegalias não neoplásicas, como hematoma, hiperplasia nodular, doença imunomediada e torção esplênica (MARINO et al., 1994). Os mesmos autores ressaltaram que o traçado eletrocardiográfico de um minuto não é tão eficaz na detecção de arritmias ventriculares quanto a monitorização por Holter durante 48hs.

Segundo Keyes et al. (1993), a partir de estudo retrospectivo com 73 cães, a presença de arritmia se correlacionou de modo significativo à anemia, enquanto que a idade, a raça, o peso, anormalidades eletrolíticas e presença de hemoperitônio não se relacionaram com a presença de arritmias ventriculares.

Contrário aos referidos autores, os resultados do presente estudo demonstram que não houve diferença significativa no valor do hematócrito dos cães que apresentaram traçado eletrocardiográfico normal e dos cães com arritmia. Já com relação à presença de hemoperitônio, observou-se arritmia em 44% dos cães com ruptura esplênica, comparado a 16% dos cães sem a ruptura do órgão.

Em estudo realizado com 106 cães com massas esplênicas, Knapp et al. (1993) observaram que 12 cães apresentaram arritmia ventricular antes ou durante a esplenectomia e em outros 25 cães, tal arritmia foi observada algumas horas ou dias após a cirurgia. No presente levantamento o traçado eletrocardiográfico foi obtido previamente à cirurgia, não sendo possível apontar, com precisão, a ocorrência de arritmias no trans ou pós-operatório.

Animais com esplenomegalia podem apresentar contagem de eritrócitos normal ou aumentada, mas freqüentemente está diminuída. Na presente pesquisa, anemia foi um achado freqüente, sendo mais evidente no grupo de cães com neoplasias malignas do que nas afecções benignas. Considerando-se como valor mínimo para a espécie canina o hematócrito de 37%, sessenta e dois por cento dos animais encontravam-se abaixo da normalidade.

Quando avaliados em grupos, 80% dos animais com neoplasia esplênica maligna e 51% dos cães com afecções benignas apresentaram anemia. A média de hematócrito dos animais com afecção benigna foi de 35% enquanto nas neoplasias malignas, foi de 29%, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,005$ ).

Diversos fatores podem justificar o baixo valor de hematócrito nestes pacientes: infiltração neoplásica da medula óssea, hemólise secundária à microangiopatia, aumento da função eritrofagocitária e perda de sangue pelo tumor. No presente estudo, os animais com hemoperitônio obtiveram valor médio de hematócrito igual a 25% ( $\pm 7$ ) comparado a 35% ( $\pm 10$ ) dos que não apresentavam hemoperitônio.

Já Weinstein et al. (1989), estudando casos de sarcomas esplênicos, acreditaram que a principal causa da anemia seria a cronicidade da doença e não a perda sanguínea pelo tumor.

Johnson et al. (1989) observaram que cães com anemia, associada à presença de reticulócitos, morfologia eritrocitária anormal ou ruptura esplênica tem maior incidência de doença esplênica neoplásica do que não neoplásica. No presente estudo, não foi possível coletar dados acurados referentes à morfologia eritrocitária ou a quantidade de reticulócitos circulantes.

Um aumento significativo das células brancas com desvio à esquerda é comumente encontrado nos cães com torção esplênica e hemangiossarcoma (MARINO, 2000; MORAIS; O'BRIEN, 2005).

Em 1989, Weinstein et al. estudaram 57 casos de sarcomas esplênicos não angiogênicos e não linfáticos e observaram leucocitose por neutrofilia, atribuindo tal anormalidade às áreas de necrose tumoral ou à elevada resposta medular à anemia.

Corroborando com os demais autores, pode-se observar leucocitose na maioria dos animais, independente do diagnóstico. A contagem de leucócitos dos animais com neoplasia maligna não foi diferente dos pacientes com afecções benignas, o mesmo ocorrendo entre os grupos de doenças neoplásicas ou não neoplásicas.

Devido à prevalência de coagulação intravascular disseminada nos casos de esplenomegalia, a realização do perfil de coagulação e a contagem de plaquetas são sempre recomendadas. Assim como acontece com os eritrócitos, a contagem de plaquetas normalmente encontra-se diminuída.

Hammond et al. (2008) observaram que cães com hemangiossarcoma apresentaram contagem de plaquetas significativamente menor que nos pacientes com outras massas esplênicas, podendo ser considerado fator preditivo da

neoplasia.

Estudos sugerem que 75 a 97% dos cães com hemangiossarcoma apresentam-se com trombocitopenia, variando de moderada à severa (HAMMER et al., 1991).

Diferente do encontrado em literatura, no presente estudo a média de contagem de plaquetas foi de 289.000, estando dentro da normalidade na maioria dos pacientes. Mesmo dentre os cães com hemangiossarcoma, não se observou trombocitopenia na maioria dos animais.

Já no grupo de pacientes com hemoperitônio, a trombocitopenia foi mais evidente, com média de 152.563 plaquetas/mm<sup>3</sup> ( $\pm 100.730$ ) comparado a média de 306.075 ( $\pm 188.458$ ) dos pacientes sem este achado clínico. Tal fato provavelmente se deve mais ao consumo plaquetário secundário à hemorragia do que ao tipo histológico da massa esplênica.

Estudos apontam diminuição da concentração de proteína plasmática nos cães com esplenomegalia. Hammond e Pesillo-Crosby (2008) observaram que, quando é escolhido como valor de corte 5,8 mg de proteína plasmática por decilitro, observou-se um valor preditivo positivo de 87% e um valor preditivo negativo de 42% nos casos de hemangiossarcoma. Mas os autores ressaltam que a baixa concentração da proteína plasmática é provavelmente mais representativa de hemorragia severa do que marcador preditivo para o hemangiossarcoma.

No presente estudo as concentrações médias de proteína plasmática e albumina estiveram dentro da normalidade, mesmo no grupo de cães com hemangiossarcoma.

Sabe-se que a angiogênese é indispensável para a inflamação, a reparação de órgãos e o crescimento tumoral. Nela, a expressão do gene do VEGF é induzida nas células endoteliais e células inflamatórias com intuito de estimular a secreção do VEGF.

Nos tumores, o aumento da expressão de VEGF é considerado um dos primeiros sinais da angiogênese, contribuindo para a aquisição de características malignas como rápido crescimento e metástase.

Uchida et al. (2008) estudaram a expressão e distribuição de VEGF e seu receptor FLT-1 nos tecidos caninos normais e observaram que nos vasos esplênicos, as células da musculatura lisa vascular mostraram-se fracamente positivas para ambos anticorpos, enquanto que endotélio e fibroblastos não

revelaram marcação imunohistoquímica. Observaram ainda que pequena parte dos macrófagos e linfócitos foram positivos para VEGF. Tais autores concluíram que apesar da grande concentração de vasos sanguíneos no baço, apenas uma pequena quantidade de células expressam VEGF em condições normais.

No presente estudo, os mesmos achados foram encontrados em tecido esplênico de cão saudável, submetido à imunohistoquímica para VEGF, com marcação em macrófagos e linfócitos de maneira esparsa. Já nos tumores, as células endoteliais de todos hemangiomas e hemangiossarcomas revelaram reatividade citoplasmática ao VEGF, indicada pelo alto número de células positivamente marcadas por imunohistoquímica.

Assim como observado no tecido de granulação, intensa reação foi detectada nas células inflamatórias infiltradas no tumor, como macrófagos e linfócitos, e em menor intensidade, nos fibroblastos.

Em 2006, Yonemaru et al. estudaram o VEGF em tumores vasculares e observaram marcação em todos os hemangiossarcomas e hemangiomas, ressaltando que a porcentagem de células marcadas e a intensidade de marcação nas neoplasias malignas foram bem maiores que nas benignas.

O presente estudo corrobora com os autores acima, visto que além dos hemangiossarcomas, todos os hemangiomas expressaram VEGF. A porcentagem de células positivamente marcadas no hemangiossarcoma foi significativamente maior do que nos hemangiomas ( $p < 0,05$ ), não sendo possível quantificar com precisão os tipos celulares marcados. A intensidade de marcação não foi avaliada, sendo considerada positiva a célula com qualquer sinal de marcação imunohistoquímica.

A avaliação histológica do baço freqüentemente revela acúmulo de pigmentos intracitoplasmáticos, como por exemplo, a hemossiderina, encontrada principalmente no citoplasma de macrófagos. Nos estudos previamente realizados (SABATTINI e BETTINI, 2009; YONEMARU et al., 2006), a técnica de revelação utilizada na imunohistoquímica incluiu diaminobenzidina, também conhecido como DAB, que confere coloração acastanhada não só ao VEGF, mas também à hemossiderina, podendo levar a resultados errôneos. Sendo assim, na presente pesquisa, optou-se por utilizar o revelador 3-amino-9-ethylcarbazole que trouxe a cor vermelha especificamente ao citoplasma das células positivamente marcadas para o anticorpo anti-VEGF, permitindo a diferenciação da hemossiderina.



Sabattini e Bettini (2009) estudaram a presença de VEGF-C em 40 amostras de hemangiossarcomas e 29 hemangiomas, cutâneos e viscerais, observando fraca expressão em ambos os tipos neoplásicos, sugerindo que outros fatores de crescimento estariam relacionados ao desenvolvimento das neoplasias.

Tal resultado difere dos encontrados nesta pesquisa e pode estar associado ao tipo do anticorpo utilizado na técnica imunohistoquímica. Aqui, foi utilizado VEGF-A, cujo receptor VEGFR-2 encontra-se em quase toda célula endotelial, enquanto que o VEGF-C, liga-se preferencialmente aos receptores dos vasos linfáticos (VEGFR-3).

Através da hibridização *in situ*, Yonemaru et al. (2006) detectaram a presença de RNAm de VEGF nas células endoteliais neoplásicas e nas células inflamatórias dos hemangiossarcomas, concluindo que estas células produzem o VEGF. Em contraste, os hemangiomas expressaram RNAm apenas nas células inflamatórias.

No que diz respeito aos receptores, estudos apontam que hemangiossarcomas e os hemangiomas esplênicos expressam FLT-1 e FLK-1, sendo maior a intensidade nas neoplasias malignas. Tais resultados sugerem que tanto a expressão do fator de crescimento endotelial vascular quanto de seus receptores podem estar ligados a proliferação maligna do hemangiossarcoma (YONEMARU et al., 2006).

Do mesmo modo, Sabattini e Bettini (2009) observaram maior expressão de VEGFR-3 nas neoplasias malignas do que nas benignas. Entretanto, não houve correlação entre a expressão de VEGFR-3 com atividade de proliferação celular.

A expressão de VEGF também vem sendo estudada a partir do plasma ou soro através da técnica de ELISA. Clifford et al. (2001) compararam a expressão plasmática de VEGF em 17 cães saudáveis e 16 cães com hemangiossarcoma e concluíram que sua concentração era significativamente maior no grupo de animais com a neoplasia, embora não houvesse correlação com o estágio da doença.

Troy et al. (2006) avaliaram prospectivamente 44 cães saudáveis, 54 cães com neoplasias e 16 cães com doenças não neoplásicas e concluíram que maiores concentrações séricas de VEGF são detectáveis nos pacientes com neoplasia que os demais grupos.

No presente estudo optou-se por mensurar a expressão do fator de crescimento endotelial vascular no tecido tumoral, ao invés da concentração sérica ou plasmática, com o objetivo de avaliar o envolvimento direto do VEGF no ambiente tumoral, favorecendo o emprego de futuros agentes anti-neoplásicos, e pela



facilidade de obtenção dos blocos parafinados, armazenados para fins de estudos retrospectivos.

Sabe-se que a regulação do VEGF está associada à condição de hipóxia presente nos compartimentos necróticos do tumor, sendo que sua expressão é elevada nos tumores com grau significativo de necrose. A hipóxia pode aumentar a transcrição do gene do VEGF e a estabilidade do RNAm, explicando a maior expressão de fator endotelial vascular nas células neoplásicas localizadas próximas a áreas necróticas. A baixa oxigenação tecidual ainda age sinergicamente a outros fatores, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  produzido por macrófagos e outras células inflamatórias (MINCHENKO et al., 1994).

Nesta pesquisa, ao avaliar a oxigenação tecidual através do nível do hematócrito do paciente, chegar-se-á a mesma conclusão que RESTUCCI et al. (2002), já que os pacientes com maior expressão de VEGF apresentaram-se com níveis de hematócrito significativamente menor ( $p < 0,05$ ).

A trombocitopenia em cães com hemangiossarcoma pode ser associada ao consumo secundário à coagulação intravascular disseminada. A destruição de plaquetas teoricamente elevaria os níveis circulantes de VEGF (CLIFFORD et al., 2001). Sendo assim, baixa contagem de plaquetas poderia significar alta concentração de VEGF.

Embora o estudo aqui realizado não mensurasse VEGF plasmático, e sim tecidual, não se observou diminuição estatisticamente significativa na contagem de plaquetas nos pacientes com maior expressão de VEGF.

## 7 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

1. É alta a prevalência de esplenomegalias em cães.
2. Nos cães com esplenomegalia, a contagem de hemácia e o valor de hematócrito abaixo do normal, e a presença de hemoperitônio no momento do diagnóstico, encontram-se relacionados com a presença de neoplasia esplênica maligna.
3. Os espécimes tumorais de cães portadores de neoplasia esplênica expressam fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).
4. Nos cães, os hemangiossarcomas esplênicos expressam quantidade significativamente maior de VEGF do que os hemangiomas esplênicos.

## REFERÊNCIAS

AL-DISSI, A. N.; HAINES, D. M.; SINGH, B.; KIDNEY, B. A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor in canine cutaneous fibrosarcomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 141, n. 4, p. 229-236, 2009.

BORGSTROM, P.; BOURDON, M. A.; HILLAN, K. J.; SRIRAMARAO, P.; FERRARA, N. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. **The Prostate**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 1998.

CHUN, R.; THAMM, D. H. Targeting angiogenesis and tumor vasculature. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. St Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 259-266.

CLIFFORD, C. A.; HUGHES, D.; BEAL, M. W.; MACKIN, A. J.; HENRY, C. J.; SHOFER, F. S. SORENMO, K. U. Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 15, n. 2, p. 131-135, 2001.

COUTO, C. G. Moléstias dos linfonodos e baço. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1992, p. 2328-2348.

DAY, M. J.; LUCKE, V. M.; PEARSON, H. A review of pathological diagnoses from 87 canine splenic biopsies. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, n. 10, p. 426-433, 1995.

ESPADA Y, RUIZ DE GOPEGUI, R. Esplenomegalia: aproximación al diagnóstico mediante ecografía y citología. **Medicina Veterinaria**, v. 15, n. 5, p. 281-285, 1998.

FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. **Journal of Molecular Medicine**, v. 77, n. 7, p. 527-543, 1999.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 4-25, 2005.

FREY, A. J.; BETTS, C. W. A. Retrospective survey of splenectomy in the dog. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 13, n. 6, p. 730-734, 1977.

FRY, M. M.; VERNAU, W.; PESAVENTO, P.A .; BRÖMEL, C. MOORE, P.F. Hepatosplenic lymphoma in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 5, p.556-562, 2003.

GABRILOVICH, D. I.; CHEN, H. L.; GIRDIS, K. R.; CUNNINGHAM, H. T.; MENY, G.; M.; NADAF, S.; KAVANAUGH, D.; CARBONE, D. P. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 2, n. 10, p. 1096-1103, 1996.

GINEL, P. J.; LUCENA, R.; AROLA, J.; MARTIN, M. P.; MOZOS, E. Diffuse splenomegaly caused by splenic abscessation in a dog. **The Veterinary Record**, v. 149, n. 11, p. 327-329, 2001.

HAMMER, A. S.; COUTO, C. G.; SWARDSON, C.; GETSY, D. Hemostatic abnormalities in dogs with hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 5, n. 1, p. 11-14, 1991.

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

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Oncology**. v. 23, n. 5, p. 1011-1027, 2005.

HOSGOOD, G. Splenectomy in the dog: a retrospective study of 31 cases. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 32, n. 3, p. 275-283, 1987.

HOUCK, K. A. ; LEUNG, D. W.; BOWLAND, A. M.; WINER, J.; FERRARA, N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 267, n. 36, p. 26031-26037, 1992.

JOHNSON, K. A.; POWERS, B. E.; WITHROW, S. J.; SHEETZ, M. J.; CURTIS, C. R.; WRIGLEY, R. H. Splenomegaly in dogs – predictors of neoplasia and survival after splenectomy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 3, n. 3, p. 160-166, 1989.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Sistema imunitário e órgãos linfáticos. In: **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 254-283.

KEYES, M. L.; RUSH, J. E.; MORAIS, H. A. DE; COUTO, C. G. Ventricular arrhythmias in dogs with splenic masses. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 3, n. 1, p. 33-38, 1993.

KNAPP, D. W.; ARONSHON, M. G.; HARPSTER, N. K. Cardiac arrhythmias associated with mass lesions of the canine spleen. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 29, n. 2, p. 122-128, 1993.

LIPTAK, J. M.; FORREST, L. J. Soft tissue sarcomas. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small Animal Clinical Oncology**, Philadelphia: WB Saunders, 2007. p. 425-454.

MARINO, D. J. Diseases of the spleen. In: BONAGURA, J. D. **Kirk's current veterinary therapy XIII: small animal practice**, Philadelphia: WB Saunders, 2000. p. 520-524.

MARINO, D. J.; MATTHIESEN, D. T.; FOX, P. R.; LESSER M. B.; STAMOULIS, M. E. Ventricular arrhythmias in dogs undergoing splenectomy: a prospective study. **Veterinary Surgery**, v. 23, n. 2, p. 101-106, 1994.

MCCLUSKY, D. A.; SKANDALAKIS, L. J.; COLBORN, G. L.; SKANDALAKIS, J. E. Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery – part 1. **World Journal of Surgery**, v. 23, n. 3, p. 311-325, 1999.

MILLANTA, F.; CANESCHI, V.; RESSEL, L.; CITI, S.; POLI, A. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 1, p. 36-42, 2010.

MINCHENKO, A.; BAUER, T.; SALCEDA, S.; CARO, J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. **Laboratory Investigation**, v. 71, n. 3, p. 374-379, 1994.

MORAES, H. A. de; O'BRIEN, R. T. Non-neoplastic diseases of the spleen. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. v. 1. p. 1944-1951.

NEER, T. M. Clinical Approach to splenomegaly in dogs and cats. **Compendium on Continuing Education**, v. 18, n. 1, p. 35-46, 1996.

PLATT, S. R.; SCASE, T. J.; ADAMS, V.; WIECZOREK, L.; MILLER, J.; ADAMO, F.; LONG, S. Vascular endothelial growth factor expression in canine intracranial meningiomas and association with patient survival. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 663-668, 2006.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; PALTRINIERI, M. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumors of the dog. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 2/3, p. 143-151, 2004.

PRYMAK, C.; MCKEE, L. J.; GOLDSCMIDT, M. H.; CLICKMAN, L. T. Epidemiologic, clinical, pathologic, and prognostic characteristics of splenic hemangiosarcoma and splenic hematomas in dogs: 217 cases (1985). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 6, p. 706-711, 1988.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; DE VICO, G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 4, p. 488-493, 2002.

SABATTINI, S.; BETTINI, G. An immunohistochemical analysis of canine haemangioma and haemangiosarcoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 140, n. 2-3, p. 158-168, 2009.

SCHEIDEGGER, P.; WEIGLHOFER, W.; SUAREZ, S.; KASER´HOLTZ, B.; STEINER, R.; BALLMER-HOFER, K.; JAUSSE, R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in tumor-bearing dogs. **Biological Chemistry**, v. 380, n. 12, p. 1449-1454, 1999.

SOH, E. Y.; SOBHI, S. A.; WONG, M. G.; MENG, Y. G.; SIPERSTEIN, A. E.; CLARK, O. H.; DUH, Q. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. **Surgery**, v. 120, n. 6, p. 944-947, 1996.

SOKER, S.; TAKASHIMA, S.; MIAO, H. Q.; NEUFELD, G.; KLAGSBRUN, M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor, **Cell**, v. 92, n. 6, p. 735-45, 1998.

SPANGLER, W. L.; CULBERTSON, M. R. Prevalence, type, and importance of splenic diseases in dogs: 1480 cases (1985-1989) **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 6, p. 829-834, 1992.

SPANGLER, W. L.; KASS, P. H. Pathologic and prognostic characteristics of splenomegaly in dogs due to fibrohistiocytic nodules: 98 cases. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 6, p. 488-498, 1998.

THAMM, D. H. Hemangiosarcoma. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. 4. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2007. p. 785-795.

TILSON, D. M. Spleen. In: SLATTER, D. H. **Textbook of small animal surgery**. Philadelphia: WB Saunders, 2003. p. 1046-1062.

TROY, G. C.; HUCKLE, W. R.; ROSSMEISL, J. H.; PANCIERA, D.; LANZ, O.; ROBERTSON, J. L.; WARD, D. L. Endostatin and vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs, dogs with selected neoplasia, and dogs with nonneoplastic diseases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 1, p. 144-150, 2006.

UCHIDA, N.; NAGAI, K.; SAKURADA, Y.; SHIROTA, K. Distribution of VEGF and flt-1 in the normal dog tissues. **The Journal of Veterinary Medical Science**, n. 70, v. 11, p. 1273-1276, 2008.

WARREN, R. S.; YUAN, H.; MATLI, M. R.; FERRARA, N.; DONNER, D. B. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 29483-29488, 1996.

WEIDNER, N. Intratumoral vessel density as a prognostic factor in cancer. **American Journal of Pathology**, v. 147, n. 1, p. 9-19, 1995.

WEIDNER, N.; SEMPLE, J. P.; WELCH, W. R. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 1, p. 1-8, 1991.

WEINSTEIN, M. J.; CARPENTER, J. L.; MEHLHAFF SCHUNK, C. J. Nonangiogenic and nonlymphomatous sarcoma of the canine spleen: 57 cases (1975-1987). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 6, p. 784-788, 1989.

YONEMARU, K.; SAKAI, H.; MURAKAMI, M.; YANAI, T.; MASEGI, T. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptors (flt-1, flk-1, and flg-1) in canine vascular tumors. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 6, p. 971-980, 2006.

## Apêndice

Tabela 10 – Dados epidemiológicos dos animais portadores de esplenomegalias - São Paulo - 2002 – 2009

| Animal n°. | Histológico               | Raça            | Sexo | Idade | Peso (kg) | Sintoma principal          | Arritmia | Hemoperitôneo |
|------------|---------------------------|-----------------|------|-------|-----------|----------------------------|----------|---------------|
| 1          | Abscesso                  | Poodle          | f    | 14    | 8         | emese, disorexia           | -        | ausente       |
| 2          | Abscesso                  | Pit Bull        | m    | 6     | 21        | emagrecimento              | -        | ausente       |
| 3          | Abscesso                  | Pastor Alemão   | f    | 7     | 32        | disorexia                  | -        | ausente       |
| 4          | Abscesso                  | Weimaraner      | f    | 9     | 38        | diarréia                   | -        | ausente       |
| 5          | Carcinoma                 | Pastor Alemão   | f    | 6     | 36        | apatia, dor abdominal      | -        | ausente       |
| 6          | Esplenite                 | Boxer           | f    | 7     | 18        | disorexia                  | NDN      | ausente       |
| 7          | Esplenite                 | Cocker          | f    | 10    | 23        | ndn                        | NDN      | ausente       |
| 8          | Esplenite                 | Fox Paulistinha | f    | 16    | 5         | NDN                        | NDN      | ausente       |
| 9          | Esplenite                 | Beagle          | m    | 13    | 20        | distensão abdominal        | NDN      | ausente       |
| 10         | Esplenite                 | Poodle          | m    | 8     | 5         | disorexia                  | -        | ausente       |
| 11         | Esplenite                 | Pit Bull        | f    | 6     | 33        | emese                      | -        | ausente       |
| 12         | Fibrohistiocitoma maligno | SRD             | f    | 8     | 7         | distensão abdominal        | NDN      | ausente       |
| 13         | Fibrohistiocitoma maligno | Poodle          | m    | 13    | 7         | emese, dor abdominal       | NDN      | ausente       |
| 14         | Fibrohistiocitoma maligno | SRD             | f    | 11    | 11        | disorexia                  | -        | ausente       |
| 15         | Hemangioma                | Doberman        | f    | 10    | 20        | disorexia, emese           | NDN      | ausente       |
| 16         | Hemangioma                | Fox Terrier     | f    | 10    | 9         | NDN                        | -        | ausente       |
| 17         | Hemangioma                | SRD             | m    | 11    | 29        | dificuldade deambulatória  | VPC      | ausente       |
| 18         | Hemangioma                | Rottweiler      | f    | 12    | 58        | apatia                     | -        | presente      |
| 19         | Hemangioma                | Pastor Alemão   | m    | 7     | 36        | dor abdominal              | NDN      | ausente       |
| 20         | Hemangioma                | SRD             | f    | 13    | 22        | emese, diarréia, disorexia | NDN      | ausente       |
| 21         | Hemangioma                | Poodle          | f    | 11    | 5         | NDN                        | NDN      | ausente       |
| 22         | Hemangioma                | Pastor Alemão   | f    | 11    | 31        | emese                      | NDN      | ausente       |
| 23         | Hemangioma                | Poodle          | f    | 9     | 5         | distensão abdominal        | -        | ausente       |



|    |                     |               |   |    |    |                                |                         |          |
|----|---------------------|---------------|---|----|----|--------------------------------|-------------------------|----------|
| 24 | Hemangioma          | Pastor Alemão | m | 12 | 33 | disorexia, apatia              | -                       | ausente  |
| 25 | Hematoma            | Pastor Alemão | f | 12 | 37 | emese, dor abdominal           | taquicardia ventricular | ausente  |
| 26 | Hematoma            | SRD           | f | 9  | 26 | disorexia                      | NDN                     | ausente  |
| 27 | Hematoma            | Pit Bull      | m | 8  | 26 | NDN                            | NDN                     | ausente  |
| 28 | Hematoma            | SRD           | m | 13 | 31 | NDN                            | NDN                     | ausente  |
| 29 | Hematoma            | Cocker        | m | 7  | 23 | dor abdominal                  | NDN                     | ausente  |
| 30 | Hematoma            | Boxer         | f | 7  | 27 | dificuldade deambulatória      | -                       | presente |
| 31 | Hematoma            | SRD           | m | 7  | 40 | apatia                         | NDN                     | ausente  |
| 32 | Hematoma            | Labrador      | m | 10 | 37 | disorexia, apatia              | NDN                     | ausente  |
| 33 | Hematoma            | SRD           | m | 11 | 13 | distensão abdominal            | NDN                     | ausente  |
| 34 | Hematoma            | SRD           | f | 8  | 18 | NDN                            | -                       | ausente  |
| 35 | Hematoma            | Pointer       | f | 12 | 23 | apatia, emese                  | NDN                     | ausente  |
| 36 | Hematoma            | Pastor Alemão | m | 16 | 34 | diarréia, emese, disorexia     | -                       | ausente  |
| 37 | Hematoma            | SRD           | f | 8  | 12 | distensão abdominal            | -                       | ausente  |
| 38 | Hematoma            | Setter        | m | 12 | 29 | emagrecimento, polidipsia      | NDN                     | ausente  |
| 39 | Hematoma            | SRD           | f | 6  | 7  | disorexia, distensão abdominal | -                       | ausente  |
| 40 | Hematoma            | SRD           | f | 15 | 13 | emagrecimento                  | VPC                     | ausente  |
| 41 | Hematoma            | Pastor Alemão | m | 11 | 43 | apatia, distensão abdominal    | taquicardia ventricular | presente |
| 42 | Hematoma            | Pastor Alemão | m | 10 | 33 | NDN                            | -                       | ausente  |
| 43 | Hematoma            | SRD           | m | 8  | 45 | disorexia                      | -                       | ausente  |
| 44 | Hematoma            | Labrador      | m | 14 | 36 | distensão abdominal, apatia    | NDN                     | ausente  |
| 45 | Hematoma            | SRD           | m | 10 | 19 | emagrecimento                  | -                       | ausente  |
| 46 | Hematoma            | Rottweiler    | f | 5  | 38 | distensão abdominal            | -                       | ausente  |
| 47 | Hematoma            | Pastor Alemão | f | 14 | 26 | apatia                         | -                       | presente |
| 48 | Hiperplasia nodular | SRD           | f | 7  | 13 | disorexia                      | -                       | ausente  |
| 49 | Hiperplasia nodular | Setter        | m | 10 | 29 | disorexia, emese               | NDN                     | ausente  |
| 50 | Hiperplasia nodular | Weimaraner    | m | 9  | 31 | apatia                         | NDN                     | ausente  |
| 51 | Hiperplasia nodular | Fox Terrier   | f | 12 | 7  | NDN                            | NDN                     | ausente  |
| 52 | Hiperplasia nodular | SRD           | f | 11 | 10 | dor abdominal                  | VPC                     | ausente  |
| 53 | Hiperplasia nodular | Cocker        | f | 5  | 13 | disorexia                      | VPC                     | ausente  |

CAMPOS, A.G.

|    |                     |               |   |    |    |                                 |                            |          |
|----|---------------------|---------------|---|----|----|---------------------------------|----------------------------|----------|
| 54 | Hiperplasia nodular | Dachshund     | m | 8  | 8  | Apatia                          | NDN                        | ausente  |
| 55 | Hiperplasia nodular | SRD           | f | 9  | 10 | NDN                             | NDN                        | ausente  |
| 56 | Hiperplasia nodular | Poodle        | m | 11 | 9  | distensão abdominal             | -                          | ausente  |
| 57 | Hiperplasia nodular | Poodle        | f | 12 | 6  | NDN                             | -                          | ausente  |
| 58 | Hiperplasia nodular | SRD           | f | 14 | 13 | NDN                             | NDN                        | ausente  |
| 59 | Hiperplasia nodular | SRD           | f | 13 | 10 | disorexia                       | NDN                        | ausente  |
| 60 | Hiperplasia nodular | Dachshund     | f | 12 | 5  | emese, disorexia, diarreia      | -                          | ausente  |
| 61 | Hiperplasia nodular | SRD           | M | 13 | 9  | disorexia, apatia               | -                          | ausente  |
| 62 | Hiperplasia nodular | Rottweiler    | M | 9  | 52 | disorexia                       | NDN                        | ausente  |
| 63 | Hiperplasia nodular | Rottweiler    | F | 7  | 33 | distensão abdominal             | NDN                        | ausente  |
| 64 | Hiperplasia nodular | Poodle        | f | 4  | 14 | dor abdominal                   | -                          | ausente  |
| 65 | Hiperplasia nodular | Boxer         | m | 11 | 32 | distensão abdominal,<br>síncope | VPC                        | presente |
| 66 | Hiperplasia nodular | SRD           | m | 12 | 11 | emese, disorexia                | NDN                        | ausente  |
| 67 | Hiperplasia nodular | Rottweiler    | m | 13 | 42 | NDN                             | NDN                        | ausente  |
| 68 | Hiperplasia nodular | SRD           | m | 15 | 17 | diarreia, emese, disorexia      | taquicardia<br>ventricular | ausente  |
| 69 | Hiperplasia nodular | SRD           | f | 2  | 12 | emese, febre, disorexia         | -                          | ausente  |
| 70 | Hiperplasia nodular | Rottweiler    | f | 9  | 39 | disorexia, emese, polidipsia    | -                          | ausente  |
| 71 | HSA                 | Husky         | m | 11 | 25 | disorexia, diarreia, apatia     | NDN                        | presente |
| 72 | HSA                 | Pastor Alemão | f | 9  | 28 | emese, disorexia                | NDN                        | ausente  |
| 73 | HSA                 | Poodle        | m | 14 | 10 | disorexia                       | -                          | ausente  |
| 74 | HSA                 | Pastor Alemão | m | 12 | 41 | NDN                             | -                          | ausente  |
| 75 | HSA                 | Pastor Alemão | f | 12 | 40 | apatia                          | -                          | presente |
| 76 | HSA                 | Doberman      | m | 8  | 41 | disorexia, polidipsia           | NDN                        | presente |
| 77 | HSA                 | Pastor Alemão | f | 10 | 31 | apatia, disorexia               | -                          | presente |
| 78 | HSA                 | Poodle        | m | 9  | 7  | disorexia, dor abdominal        | NDN                        | ausente  |
| 79 | HSA                 | SRD           | f | 14 | 18 | emese, disorexia                | VPC                        | ausente  |
| 80 | HSA                 | SRD           | m | 11 | 31 | disorexia, dor abdominal        | NDN                        | presente |
| 81 | HSA                 | Schnauzer     | m | 11 | 8  | distensão abdominal             | -                          | ausente  |
| 82 | HSA                 | Pastor Alemão | m | 11 | 34 | disorexia, dor abdominal        | -                          | ausente  |
| 83 | HSA                 | Pointer       | f | 10 | 24 | distensão abdominal             | NDN                        | ausente  |

|     |                    |               |   |    |    |                                    |  |          |
|-----|--------------------|---------------|---|----|----|------------------------------------|--|----------|
| 84  | HSA                | Labrador      | m | 11 | 43 | disorexia                          | alteração na repolarização ventricular | presente |
| 85  | HSA                | Boxer         | f | 10 | 20 | apatia                             | NDN                                    | ausente  |
| 86  | HSA                | Pastor Alemão | m | 13 | 46 | disorexia, colúria                 | NDN                                    | ausente  |
| 87  | HSA                | Pastor Alemão | f | 10 | 33 | distensão abdominal                | NDN                                    | presente |
| 88  | HSA                | Weimaraner    | f | 11 | 27 | disorexia, apatia                  | VPC                                    | presente |
| 89  | HSA                | Pastor Alemão | m | 10 | 31 | apatia                             | NDN                                    | ausente  |
| 90  | HSA                | Lhasa Apso    | f | 9  | 14 | NDN                                | NDN                                    | ausente  |
| 91  | HSA                | Pinscher      | f | 8  | 3  | apatia, emagrecimento              | -                                      | presente |
| 92  | HSA                | Bassetthound  | f | 11 | 19 | emagrecimento, disorexia           | -                                      | ausente  |
| 93  | HSA                | Weimaraner    | f | 8  | 24 | apatia, disorexia                  | -                                      | ausente  |
| 94  | HSA                | Labrador      | m | 12 | 40 | distensão abdominal                | NDN                                    | presente |
| 95  | HSA                | Poodle        | m | 12 | 6  | apatia                             | NDN                                    | ausente  |
| 96  | HSA                | Pinscher      | f | 8  | 4  | emagrecimento, disorexia           | NDN                                    | ausente  |
| 97  | HSA                | Pit Bull      | f | 9  | 25 | emese, distensão abdominal         | -                                      | presente |
| 98  | HSA                | Pastor Alemão | m | 11 | 44 | NDN                                | NDN                                    | ausente  |
| 99  | Infarto esplênico  | Poodle        | f | 8  | 15 | emese, aquesia                     | -                                      | ausente  |
| 100 | Leiomiossarcoma    | Poodle        | m | 12 | 4  | apatia, emagrecimento              | parada sinusal                         | ausente  |
| 101 | Leiomiossarcoma    | Poodle        | f | 13 | 7  | emese, disorexia                   | -                                      | ausente  |
| 102 | Linfoma            | Poodle        | f | 12 | 6  | disorexia                          | NDN                                    | ausente  |
| 103 | Linfoma            | Dachshund     | m | 14 | 8  | distensão abdominal                | NDN                                    | ausente  |
| 104 | Linfoma            | SRD           | m | 7  | 19 | apatia, dor abdominal              | -                                      | ausente  |
| 105 | Lipossarcoma       | SRD           | f | 9  | 17 | dor abdominal                      | NDN                                    | ausente  |
| 106 | Lipossarcoma       | SRD           | m | 10 | 17 | distensão abdominal                | NDN                                    | ausente  |
| 107 | Plasmocitoma       | SRD           | f | 12 | 19 | disorexia, diarreia, emagrecimento | parada sinusal                         | ausente  |
| 108 | Sarcoma pouco dif. | Poodle        | f | 10 | 6  | apatia                             | NDN                                    | ausente  |
| 109 | TVT                | SRD           | m | 3  | 26 | NDN                                | -                                      | ausente  |

NDN: nada digno de nota; HSA: hemangiossarcoma; SRD: sem raça definida; TVT: tumor venéreo transmissível; VPC: contração ventricular prematura.

Tabela 11 – Parâmetros hematológicos dos animais portadores de esplenomegalias - São Paulo - 2002 - 2009

| Animal nº | Hematócrito (%) | Hemácias (milhões/ mm <sup>3</sup> ) | Leucócitos (milhões/ mm <sup>3</sup> ) | Plaquetas (milhões/ mm <sup>3</sup> ) | Proteína total (g/dl) | Albumina (g/dl) |
|-----------|-----------------|--------------------------------------|--|---------------------------------------|-----------------------|-----------------|
| 1         | 13              | 2                                    | 24000                                  | 44000                                 | -                     | -               |
| 2         | 33              | 4,8                                  | 39200                                  | 205000                                | 7,2                   | 2,7             |
| 3         | 18              | 2,4                                  | 23000                                  | 204000                                | 7,4                   | 2,4             |
| 4         | 27              | 4                                    | 70700                                  | 334000                                | -                     | -               |
| 5         | 20              | 2,8                                  | 39400                                  | 228000                                | 4,6                   | 1,6             |
| 6         | 42              | 6,8                                  | 9200                                   | 326000                                | 7,2                   | 2,8             |
| 7         | 28              | 4                                    | 8600                                   | 452000                                | 8,2                   | 3,2             |
| 8         | 42              | 6                                    | 49100                                  | 430000                                | 7,2                   | 2,4             |
| 9         | 33              | 5,4                                  | 7500                                   | 269000                                | -                     | -               |
| 10        | 16              | 2,4                                  | 59200                                  | 42000                                 | 5                     | 1,7             |
| 11        | 23              | 3,6                                  | 53300                                  | 209000                                | 6,8                   | 2,9             |
| 12        | 35              | 5,7                                  | 11700                                  | 427000                                | 7,7                   | 1,7             |
| 13        | 32              | 4,9                                  | 22000                                  | 577000                                | 7,2                   | 2,8             |
| 14        | 24              | 4                                    | 7832                                   | 293000                                | 8,8                   | 1,7             |
| 15        | 40              | 6,2                                  | 10600                                  | 345000                                | 6,8                   | 2,7             |
| 16        | 44              | 6,1                                  | 12200                                  | 198000                                | -                     | -               |
| 17        | 34              | 5,1                                  | 25500                                  | 245000                                | 7,5                   | -               |
| 18        | 29              | 4,3                                  | 6400                                   | 220000                                | 6,6                   | 2,8             |
| 19        | 39              | 5                                    | 25200                                  | 189000                                | 6,4                   | 2,5             |
| 20        | 37              | 5,6                                  | 15800                                  | 186000                                | -                     | -               |
| 21        | 54              | 7,6                                  | 11600                                  | 164000                                | 6,7                   | 3,3             |
| 22        | 44              | 6,5                                  | 9384                                   | 346000                                | 7,2                   | 3,4             |
| 23        | 44              | 6,7                                  | 8600                                   | 281000                                | 7,4                   | 3,6             |
| 24        | 35              | 5,8                                  | 19900                                  | 714000                                | -                     | -               |
| 25        | 39              | 6,1                                  | 9250                                   | 294000                                | 5,8                   | 2,6             |
| 26        | 52              | 8,8                                  | 9000                                   | 285000                                | -                     | -               |

|    |    |     |        |        |     |     |
|----|----|-----|--------|--------|-----|-----|
| 27 | 46 | 7,4 | 10300  | 269000 | 7,5 | 3   |
| 28 | 28 | 4,7 | 17900  | 294000 | -   | -   |
| 29 | 33 | 5   | 8000   | 433000 | 7,6 | 2,8 |
| 30 | 39 | 6   | 24000  | 245000 | 4,9 | 2,6 |
| 31 | 44 | 6,6 | 11600  | 404000 | 7   | -   |
| 32 | 32 | 5,3 | 9100   | 432000 | 7,9 | 2,1 |
| 33 | 38 | 6,3 | 6100   | 205000 | 12  | -   |
| 34 | 53 | 8   | 1900   | 141000 | -   | -   |
| 35 | 46 | 6,6 | 6900   | 225000 | 8,3 | 3   |
| 36 | 31 | 4,7 | 9500   | 225000 | 6,2 | 2,4 |
| 37 | 35 | 5,2 | 6800   | 227000 | 8,1 | -   |
| 38 | 41 | 6,3 | 125000 | 295000 | 7,4 | 2,5 |
| 39 | 24 | 2,8 | 13200  | 363000 | 10  | 2,1 |
| 40 | 38 | 4,6 | 16500  | 388000 | 6,8 | 2,4 |
| 41 | 22 | 3,6 | 23700  | 407000 | 5,1 | 2,2 |
| 42 | 41 | 6,4 | 13400  | 205000 | 6,2 | 2,8 |
| 43 | 22 | 3,1 | 8700   | 41000  | 5,5 | 2   |
| 44 | 25 | 3,8 | 31300  | 195000 | 6,3 | 2,7 |
| 45 | 16 | 2,5 | 12000  | 37000  | -   | 1,7 |
| 46 | 20 | 2,6 | 17600  | 162000 | 7   | 2,2 |
| 47 | 22 | 3   | 19900  | 127000 | 4.5 | 2   |
| 48 | 30 | 4,8 | 21700  | 386000 | 6,3 | 2   |
| 49 | 43 | 6,2 | 41400  | 198000 | -   | -   |
| 50 | 49 | 8,2 | 12900  | 221000 | -   | -   |
| 51 | 44 | 6,8 | 10920  | 331000 | 6,4 | 2,8 |
| 52 | 48 | 7,6 | 8500   | 255000 | 7   | -   |
| 53 | 54 | 7,7 | 9200   | 421000 | 7,2 | 3,8 |
| 54 | 37 | 5,3 | 24200  | 245000 | 5,9 | 2,6 |
| 55 | 48 | 7   | 8600   | 232000 | 7,6 | 3.1 |
| 56 | 42 | 6,9 | 39400  | 273000 | 7,2 | 2,9 |
| 57 | 32 | 4,9 | 39500  | 544000 | 7,7 | 2,5 |
| 58 | 44 | 6,5 | 10500  | 700000 | 7.3 | 2.5 |

|    |    |     |       |        |     |     |
|----|----|-----|-------|--------|-----|-----|
| 59 | 56 | 8,2 | 6300  | 272000 | 6,7 | 2,9 |
| 60 | 35 | 5,3 | 9400  | 195000 | 5,5 | 2,3 |
| 61 | 32 | 4,6 | 14800 | 197000 | 4,8 | 1,7 |
| 62 | 43 | 6,6 | 10900 | 284000 | 6,7 | 2,9 |
| 63 | 35 | 5,1 | 18800 | 572000 | 5,6 | 2,2 |
| 64 | 32 | 4,6 | 14400 | 266000 | 8,2 | 2,9 |
| 65 | 21 | 2,5 | 21300 | 80000  | 5,7 | 2,8 |
| 66 | 22 | 3,4 | 26100 | 427000 | 7,4 | 2,3 |
| 67 | 40 | 5,7 | 8300  | 414000 | 8,2 | 3,6 |
| 68 | 24 | 3,4 | 18000 | 141000 | 6,8 | 3   |
| 69 | 27 | 4   | 64000 | 374000 | 6,4 | 2,1 |
| 70 | 24 | 4   | 46800 | 273000 | 8,9 | 1,9 |
| 71 | 13 | 1,7 | 40000 | 53000  | 5,1 | 1,7 |
| 72 | 42 | 5,7 | 11400 | 272000 | 6,4 | 3   |
| 73 | 28 | 4,6 | 53300 | 468000 | 5,8 | 2,1 |
| 74 | 47 | 7,3 | 11800 | 234000 | -   | -   |
| 75 | 16 | 2,2 | 20900 | 89000  | -   | -   |
| 76 | 27 | 4,1 | 26400 | 89000  | 7,3 | 3   |
| 77 | 23 | 3,8 | 17200 | 44000  | 5,3 | 2,6 |
| 78 | 26 | 3,3 | 9200  | 93000  | 7,7 | 3,1 |
| 79 | 37 | 6,1 | 27455 | 470000 | 6,8 | 2,2 |
| 80 | 29 | 4,1 | 15800 | 125000 | 6,2 | 3,4 |
| 81 | 25 | 3,9 | 23400 | 184000 | 7,4 | -   |
| 82 | 44 | 6,7 | 12000 | 290000 | 6,5 | 3   |
| 83 | 35 | 4,8 | 18300 | 155000 | 7,4 | 3,4 |
| 84 | 29 | 4,9 | 12835 | 141000 | 7,4 | 3,4 |
| 85 | 33 | 5,5 | 7500  | 269000 | 6   | 2,5 |
| 86 | 28 | 3,9 | 17600 | 126000 | 8   | 1,8 |
| 87 | 20 | 3,3 | 15600 | 320000 | 6,4 | 3   |
| 88 | 19 | 2,5 | 25300 | 92000  | 6,1 | 2,9 |
| 89 | 14 | 1,4 | 73400 | 237000 | 5,9 | 2   |
| 90 | 27 | 4,4 | 20100 | 197000 | 8,2 | 3,3 |

|     |    |     |        |         |     |     |
|-----|----|-----|--------|---------|-----|-----|
| 91  | 36 | 5,9 | 26300  | 167000  | -   | -   |
| 92  | 25 | 4,1 | 20800  | 125000  | 7   | 2,7 |
| 93  | 24 | 3,7 | 14300  | 190000  | 7   | 4   |
| 94  | 29 | 4,5 | 20400  | 165000  | 6,4 | 3,6 |
| 95  | 26 | 4   | 22500  | 101000  | 7   | 3,3 |
| 96  | 31 | 5,1 | 21100  | 862000  | 6,7 | 2,7 |
| 97  | 21 | 2,8 | 62000  | 77000   | 7,6 | 3,4 |
| 98  | 39 | 6   | 11900  | 191000  | 6,3 | 3   |
| 99  | 41 | 6   | 38300  | 212000  | 7,6 | 2   |
| 100 | 32 | 4,6 | 25000  | 501000  | 6,2 | 2,7 |
| 101 | 39 | 5,5 | 31200  | 197000  | 7,2 | 2,1 |
| 102 | 48 | 7,3 | 15000  | 771000  | 7,2 | -   |
| 103 | 39 | 6,5 | 12500  | 800000  | -   | -   |
| 104 | 37 | 5,3 | 9400   | 345000  | -   | -   |
| 105 | 33 | 5,5 | 10000  | 1220000 | 6,7 | 3   |
| 106 | 36 | 5,7 | 16000  | 352000  | -   | -   |
| 107 | 27 | 4   | 9000   | 116000  | 8,7 | 1,8 |
| 108 | 22 | 3,1 | 135600 | 240000  | 6   | 1,7 |
| 109 | 35 | 5,5 | 10600  | 198000  | 6,4 | 2,1 |

Tabela 12 – Contagem das células que expressaram VEGF nos hemangiomas e hemangiossarcomas esplênicos, e seus respectivos valores hematológicos - São Paulo - 2002 - 2009

| Animal n° | Diagnóstico | Total de células contadas | VEGF positivas | VEGF negativas | Hematócrito (%) | Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> ) | Leucócitos (milhões/mm <sup>3</sup> ) | Plaquetas (milhões/mm <sup>3</sup> ) | Proteína Total (g/dl) | Albumina (g/dl) |
|-----------|-------------|---------------------------|----------------|----------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------|
| 1         | Hemangioma  | 2342                      | 1317           | 1025           | 40              | 6,2                                 | 10600                                 | 345000                               | 6,8                   | 2,7             |
| 2         | Hemangioma  | 2008                      | 1335           | 673            | 29              | 4,3                                 | 6400                                  | 220000                               | 6,6                   | 2,8             |
| 3         | Hemangioma  | 2913                      | 1413           | 1500           | 39              | 5                                   | 25200                                 | 189000                               | 6,4                   | 2,5             |
| 4         | Hemangioma  | 2860                      | 1669           | 1191           | 37              | 5,6                                 | 15800                                 | 186000                               | -                     | -               |
| 5         | Hemangioma  | 2194                      | 1241           | 953            | 44              | 6,5                                 | 9384                                  | 346000                               | 7,2                   | 3,4             |
| 6         | Hemangioma  | 2474                      | 1263           | 1211           | 44              | 6,7                                 | 8600                                  | 281000                               | 7,4                   | 3,6             |
| 7         | Hemangioma  | 2246                      | 1492           | 754            | 35              | 5,8                                 | 19900                                 | 714000                               | -                     | -               |
| 8         | HSA         | 2411                      | 1239           | 1172           | 13              | 1,7                                 | 40000                                 | 53000                                | 5,1                   | 1,7             |
| 9         | HSA         | 4450                      | 3117           | 1333           | 42              | 5,7                                 | 11400                                 | 272000                               | 6,4                   | 3               |
| 10        | HSA         | 2742                      | 1566           | 1176           | 28              | 4,6                                 | 53300                                 | 468000                               | 5,8                   | 2,1             |
| 11        | HSA         | 2599                      | 1769           | 830            | 47              | 7,3                                 | 11800                                 | 234000                               | -                     | -               |
| 12        | HSA         | 5870                      | 3134           | 2736           | 16              | 2,2                                 | 20900                                 | 89000                                | -                     | -               |
| 13        | HSA         | 2079                      | 1209           | 870            | 27              | 4,1                                 | 26400                                 | 89000                                | 7,3                   | 3               |
| 14        | HSA         | 3237                      | 2314           | 923            | 23              | 3,8                                 | 17200                                 | 44000                                | 5,3                   | 2,6             |
| 15        | HSA         | 2942                      | 2294           | 648            | 26              | 3,3                                 | 9200                                  | 93000                                | 7,7                   | 3,1             |
| 16        | HSA         | 2265                      | 1534           | 731            | 37              | 6,1                                 | 27455                                 | 470000                               | 6,8                   | 2,2             |
| 17        | HSA         | 3789                      | 2200           | 1589           | 29              | 4,1                                 | 15800                                 | 125000                               | 6,2                   | 3,4             |
| 18        | HSA         | 2119                      | 1240           | 879            | 25              | 3,9                                 | 23400                                 | 184000                               | 7,4                   | -               |
| 19        | HSA         | 3560                      | 2008           | 1552           | 29              | 4,9                                 | 12835                                 | 141000                               | 7,4                   | 3,4             |



|    |     |      |      |      |    |     |       |        |     |     |
|----|-----|------|------|------|----|-----|-------|--------|-----|-----|
| 20 | HSA | 3840 | 2614 | 1226 | 28 | 3,9 | 17600 | 126000 | 8   | 1,8 |
| 21 | HSA | 2126 | 1461 | 665  | 20 | 3,3 | 15600 | 320000 | 6,4 | 3   |
| 22 | HSA | 3658 | 2404 | 1254 | 19 | 2,5 | 25300 | 92000  | 6,1 | 2,9 |
| 23 | HSA | 3912 | 2544 | 1368 | 14 | 1,4 | 73400 | 237000 | 5,9 | 2   |
| 24 | HSA | 2948 | 1731 | 1217 | 36 | 5,9 | 26300 | 167000 | -   | -   |
| 25 | HSA | 2230 | 994  | 1236 | 24 | 3,7 | 14300 | 190000 | 7   | 4   |
| 26 | HSA | 2887 | 1827 | 1060 | 29 | 4,5 | 20400 | 165000 | 6,4 | 3,6 |
| 27 | HSA | 2235 | 1447 | 788  | 26 | 4   | 22500 | 101000 | 7   | 3,3 |
| 28 | HSA | 2602 | 1391 | 1211 | 31 | 5,1 | 21100 | 862000 | 6,7 | 2,7 |
| 29 | HSA | 2365 | 1533 | 832  | 21 | 2,8 | 62000 | 77000  | 7,6 | 3,4 |
| 30 | HSA | 2071 | 921  | 1150 | 39 | 6   | 11900 | 191000 | 6,3 | 3   |

HSA: hemangiossarcoma

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)